

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

EAP DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**“ESTUDIO DEL EFECTO NEUROPROTECTOR
DEL ACEITE DE SACHA INCHI (PLUKENETIA
VOLUBILIS) EN LA NEUROTOXICIDAD
INDUCIDA POR METILMERCURIO DURANTE
LA GESTACIÓN Y LACTANCIA EN RATAS”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Peter Rolando Barrera Pérez

ASESOR

Jesús Víctor Lizano Gutiérrez

Lima – Perú

2015

*Dedico la presente tesis a mi madre Elsa
Pérez Hinojoza por su apoyo incondicional,
paciencia, por darme la vida y estar a mi lado
en los momentos más difíciles.*

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi sincero agradecimiento a todas las personas e Instituciones que colaboraron para la realización de la presente tesis.

Especialmente a:

Antonio Lipa Castro que sin su participación, este trabajo no se hubiera realizado.

Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), por las instalaciones proporcionadas.

Dr. Jesús Víctor Lizano Gutiérrez y Francisco Javier María Ramírez Cruz, por su orientación científica y apoyo constante durante todo el proceso de elaboración de la tesis.

Dr. José Ernesto Ráez González por su apoyo incondicional en el análisis histológico.

Instituto de patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), por las instalaciones proporcionadas.

Mis padres y hermanas por apoyarme en todo momento.

RESUMEN

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), especialmente el Omega 3 y 6 se encuentran en grandes cantidades en el aceite de *Plukenetia volubilis* L. “Sacha Inchi”, estos PUFAS se transforman en el organismo en DPA, DHA y ARA respectivamente, estos son componentes estructurales importantes en SNC y participan en su desarrollo.

Numerosos trabajos concluyen que la dieta suplementada con PUFAs reducen la neurotoxicidad del metilmercurio. El presente trabajo busca evaluar el efecto neuroprotector del aceite de *Plukenetia volubilis* L. “Sacha Inchi” sobre la neurotoxicidad inducida por metilmercurio (MeHg) en ratas crías expuestas durante el periodo de gestación y lactancia.

Para ello se utilizaron ratas nulíparas separadas aleatoriamente en cinco grupos: N°1(DMSO), N°2 (DMSO + aceite de *Plukenetia volubilis* L. a una dosis de 2 mL/Kg/día), N°3 (DMSO + MeHg a una dosis de 0,75 mg/Kg/día + aceite de *Plukenetia volubilis* L. a una dosis de 2 mL/Kg/día), N°4 (DMSO + MeHg a una dosis de 0,75 mg/Kg/día + aceite de *Plukenetia volubilis* L. a una dosis de 4 mL/Kg/día) y el N°5 DMSO + MeHg a una dosis de 0,75 mg/Kg/día). El MeHg y DMSO se administraron en el agua de bebida y el aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” por vía Orogástrica.

Con los objetivo de evaluar la capacidad de aprendizaje las ratas crías con tres meses de edad se sometieron al test de discriminación

condicional en un laberinto en Y, para evaluar el daño tisular se utilizó la técnica de fijación del cerebelo en parafina con Eosina – Hematoxilina y el estrés oxidativo se evaluó midiendo el MDA utilizando la técnica del TBARs.

Todos los resultados tienen significancia estadística y demuestran que la dieta suplementada con aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” disminuye los efectos tóxicos del Metilmercurio en la capacidad de aprendizaje, daño tisular y estrés oxidativo.

Palabras clave: aceite de *Plukenetia volubilis* L., sacha inchi, Metilmercurio, Neurotoxicidad, Neuroprotección, aprendizaje, gestación y lactancia.

ABSTRACT

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs), especially Omega 3 and 6 are found in large quantities in the oil *Plukenetia volubilis* L. "Sacha Inchi" these PUFAs are transformed in the body in DPA, DHA and ARA, respectively, are structural components important in CNS and participate in its development.

Numerous studies conclude that the diet supplemented with PUFAs reduce the neurotoxicity of methylmercury. This paper evaluates the neuroprotective effect of *Plukenetia volubilis* L. "Sacha Inchi" oil on methylmercury-induced neurotoxicity in offspring exposed during periods of pregnancy and lactation rats. Neurotoxicity was induced by methylmercury chloride (MeHgCl).

For this, nulliparous rats were randomly separated into five groups: No. 1 (DMSO), No. 2 (DMSO + L. *Plukenetia volubilis* oil 2 ml / kg / day), No. 3 (DMSO + 0.75 mg MeHgCl / Kg / day + L. *Plukenetia volubilis* oil 2 ml / kg / day), No. 4 (DMSO + MeHgCl 0.75 mg / Kg / day + L. *Plukenetia volubilis* oil 4 mL / kg / day) and No. 5 MeHgCl DMSO + 0.75 mg / kg / day). The MeHgCl and DMSO were administered in the drinking water and *Plukenetia volubilis* L. "sacha inchi" oil by orogastric via.

With the aim of evaluating the learning ability of rats offspring with three months , In this study they were underwent with the conditional discrimination test in a Y maze, in order to assess tissue damage

clamping technology cerebellum was used in paraffin eosin - hematoxylin and oxidative stress was evaluated by measuring MDA using TBARs technique.

All results are statistically significant and show that diet supplemented with *Plukenetia volubilis* L. "sacha inchi" oil reduces the toxic effects of methylmercury in learning ability, tissue damage and oxidative stress.

Keywords: oil *Plukenetia volubilis* L., sacha inchi, Methylmercury, neurotoxicity, neuroprotection, learning, pregnancy and lactation.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	GENERALIDADES	4
	2.1. SUSTANCIAS NEUROTÓXICAS	4
	2.1.1. METILMERCURIO	4
	2.1.2. NEUROTOXICIDAD DEL METILMERCURIO	6
	2.2. MEMORIA Y APRENDIZAJE	11
	2.2.1. BASES NEUROFISIOLÓGICAS DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA	11
	2.2.2. EL CEREBELO EN LOS PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA	13
	2.2.3. ESTRUCTURA DEL CEREBELO	13
	2.2.4. TEST DE APRENDIZAJE	15
	2.2.5. LABERINTO EN FORMA DE Y	18
	2.3. ÁCIDOS GRASOS	19
	2.3.1. ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES	20
	2.3.2. ÁCIDO GRASO OMEGA 3 A NIVEL CEREBRAL	21
	2.4. ESTRÉS OXIDATIVO	25
	2.4.1. AGENTES OXIDANTES (RADICALES LIBRES	26
	2.4.2. OXIDACIÓN DE PROTEINAS	30
	2.4.3. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	30
	2.4.4. MECANISMOS DE PROTECCIÓN	34
	2.5. <i>Plukenetia volubilis</i> L. (sacha inchi	38
III.	PARTE EXPERIMENTAL	42
	3.1. MATERIALES Y MÉTODOS	42

3.1.1. REACTIVOS	42
3.1.2. MATERIAL BIOLÓGICO	42
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	43
3.3. TEST DE APRENDIZAJE: DISCRIMINACIÓN CONDICIONAL EN UN LABERITO EN Y	45
3.4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	48
3.5. ANÁLISIS BIOQUÍMICO	49
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
IV. RESULTADOS	54
4.1. TEST DE LABERINTO EN Y	55
4.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	58
4.3. ANÁLISIS BIOQUÍMICO	60
V. DISCUSIÓN	62
VI. CONCLUSIONES	66
VII. RECOMENDACIONES	67
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	68
IX. ANEXOS	

ABREVIATURAS

- MeHg: Metilmercurio.
- MeHgCl: Cloruro de metilmercurio.
- EROS: Especies reactivas del Oxígeno.
- DHA: Acido docosaheptaenoico
- PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados
- EPA: Acido eicosapentaenoico
- AD: Enfermedad de Alzheimer
- LAT: L-type neutral amino acid carrier transport system
- MDA: Malonaldehido.
- TBARs: Sustancias reactivas al Ácido Tiobarbitúrico
- LA: Ácido Linoleico.
- ALA: Ácido Alfa Linolénico.
- DPA: Ácido Docosapentaenoico.
- AA: Ácido Araquidónico.
- SNC: Sistema Nervioso Central.
- DGLA: Ácido dihomo-gama-linolénico.
- DMSO: Dimetil Sulfóxido.
- GD7: Siete días de gestación.
- PND21: 21 días postnatal.
- BHT: Butil-hidroxi-tolueno.

I. INTRODUCCIÓN.

Numerosos estudios revelan que la ausencia de determinados ácidos grasos en la dieta contribuyen al deterioro cognitivo y la demencia ¹. Las membranas del tejido cerebral son ricas en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (n-3 PUFAs), incluyendo el ácido docosahexaenoico (DHA), que es importantes para la fluidez de la membrana ², además el ácido eicosapentaenoico (EPA) tiene un importante rol neuroprotector ^{3,4}.

Los estudios de la enfermedad de Alzheimer (AD) en modelos animales apoyan la hipótesis de un papel protector de los PUFAs n-3 ⁵. Ensayos clínicos aleatorios sobre el efecto de la dieta suplementada con PUFAs n-3 son concluyentes, al reportar que los PUFAs n-3 mejoran los síntomas del Alzheimer revertiendo la disfunción cognitiva y la pérdida de la memoria ^{6 - 10}.

El aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” tiene cantidades considerables de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), similares al aceite de Linaza ^{11,12}. El análisis de estos ácidos grasos revelan contenidos de ácido linoléico comparables al aceite de maní; ácido α -linolénico (omega 3) superiores a los aceites de soya, maíz, maní, girasol, algodón, palma y oliva ¹³.

Por otra parte los estudios toxicológicos sobre la exposición al metilmercurio (MeHg) en humanos han demostrado que el sistema nervioso central (SNC) es uno de los principales órgano diana para su

toxicidad ¹⁴. Este hecho se asocia a su capacidad de cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica y placentaria, por lo que se acumula en el cerebelo, la corteza cerebral y la retina ¹⁵.

En un estudio realizado por el Centro para el Análisis de Riesgos de la Universidad de Harvard, se concluyó que los efectos adversos de la exposición fetal al metilmercurio se compensan con los efectos beneficiosos de los ácidos grasos poliinsaturados tipo Omega 3 sobre el Coeficiente intelectual en los niños de la población de EE.UU. ^{16,17}

Son objetivos del presente trabajo:

GENERAL.

- Estudiar el efecto neuroprotector del aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” sobre la neurotoxicidad inducida por metilmercurio en ratas crías expuestas durante el periodo de gestación y lactancia.

ESPECÍFICOS.

- Evaluar el efecto del aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” sobre la capacidad de aprendizaje en ratas crías expuestas al metilmercurio en periodo de gestación y lactancia utilizando el Test del Laberinto de Y.
- Evaluar el efecto del aceite *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”) sobre el estrés oxidativo en ratas crías expuestas al metilmercurio

en periodo de gestación y lactancia a través de la prueba de TBARs (sustancias reactivas al tiobarbiturico)

- Evaluar el efecto del aceite *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”) sobre daño del tejido cerebeloso en ratas crías expuestas al metilmercurio en periodo de gestación y lactancia por medio del análisis histológico.

II. GENERALIDADES

Los desórdenes neurológicos constituyen un importante problema de salud que enfrenta la sociedad, generando gran número de hospitalizaciones y discapacidad ¹⁸. La evidencia señala que existe una estrecha relación entre la exposición a contaminantes químicos y la disminución de la capacidad de aprendizaje , el estrés oxidativo y el deterioro tisular del SNC, teniendo como consecuencia trastornos neurológicos /enfermedades mentales, tales como autismo¹⁹, enfermedad de Parkinson ²⁰, Alzheimer ²¹, esclerosis lateral amiotrófica ²², entre otros. Los contaminantes químicos más importantes han reportado efectos neurotóxicos en humanos con exposición a niveles de relevancia ambiental, como los bifenilos-policlorados ²³, arsénico ²⁴, plomo ²⁵, manganeso ²⁶, pesticidas ²⁷, hidrocarburos aromáticos policíclicos ²⁸ y compuestos del mercurio ²⁹.

2.1. SUSTANCIAS NEUROTÓXICAS

2.1.1. METILMERCURIO

Los compuestos mercuriales son los mayores contaminantes medioambientales, existen en tres formas químicas diferentes: vapores de mercurio elemental, sales de mercurio inorgánico y orgánico. La emisión sustancial del mercurio ocurre naturalmente en los volcanes, sedimentos oceánicos, desgasificación de la corteza e incendios forestales, mientras que las fuentes antropogénicas son minería, industria

química y utilización de combustibles fósiles. Estos compuestos una vez liberados al medio ambiente entran al ciclo global del mercurio ³⁰.

El mercurio orgánico se origina a partir del inorgánico en ríos, lagos y océanos, como resultado de la actividad metiladora de las bacterias reductoras de sulfato ³¹.

En la cadena alimenticia acuática el metilmercurio se bioacumula y biomagnifica, siendo los peces predadores tales como la trucha, el bonito y la merluza los que tienen niveles más altos, el metilmercurio se acumula especialmente en el cerebro, hígado, riñones y músculos ³².

Como resultado de la biometilación, bioacumulación y biomagnificación de los compuestos del mercurio, liberados al medio acuático principalmente por fuentes antropogénicas, los peces, mariscos y los mamíferos marinos se vuelven la principal fuente de exposición humana al metilmercurio; por lo cual las comunidades de pescadores, que dependen en gran medida de la fauna acuática para su alimentación, pueden estar expuestos a niveles tóxicos de metilmercurio ³³. Ver la Fig. 1

La toxicocinética y toxicodinámica del mercurio depende en gran medida de su forma química. Por ejemplo los compuestos orgánicos del mercurio, como el metilmercurio (MeHg), que se han estudiado ampliamente, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y placentaria, alcanzando altos niveles en el sistema nervioso central (SNC) provocando graves efectos neurotóxicos ³⁴. Numerosos estudios han

demostrado que el metilmercurio (MeHg) es un contaminante ambiental que causa déficits neurológicos en animales y seres humanos ^{33,35}.

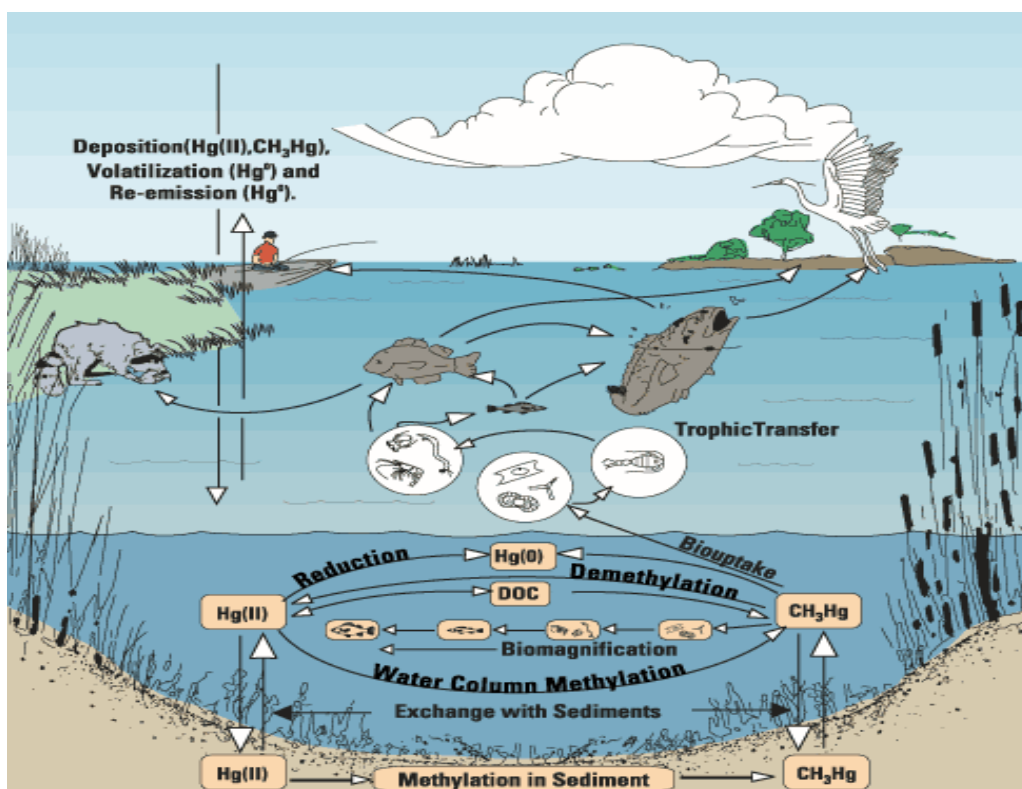


Fig. 1: Ciclo global del mercurio.

2.1.2. NEUROTOXICIDAD DEL METILMERCURIO

Mientras que los efectos tóxicos del mercurio inorgánico son conocidos desde la antigüedad ³⁶, las devastadoras consecuencias de la exposición a los compuestos orgánicos del mercurio fueron recién descubiertos en el siglo XIX. En 1865, algunos años después de la primera síntesis de metilmercurio (MeHg) por Frankland (1850), dos químicos murieron y otro se intoxicó en un derramarse de dimetilmercurio en el laboratorio donde laboraban ³⁷.

En los inicios del siglo XX el metilmercurio (MeHg) tuvo una importante aplicación como fungicida en la agricultura, incrementándose su manufactura y originando exposición ocupacional. En 1938, numerosos síntomas neurológicos fueron reportados entre trabajadores de fábricas, proporcionando la primera descripción precisa de los signos y síntomas de la intoxicación por metilmercurio (MeHg) ³⁸. La necropsia de uno de estos trabajadores fue la fuente del primer análisis histopatológico ³⁹, que identificó los cambios morfológicos en el cerebro con pérdida notable de células en el cerebro y cerebelo.

En la década de los cincuenta e inicios de los sesenta, dos desastres ocurren en Japón, en Minamata (1956) y en Niigata (1965). De acuerdo a la estimación realizada en 1999, se identificaron 2263 casos de intoxicación por metilmercurio (MeHg) en la bahía de Minamata, y 690 casos en Niigata. En ambos casos las personas fueron intoxicadas a través del consumo de alimentos marinos. El metilmercurio (MeHg) fue liberado al medio ambiente por las fábricas de acetaldehído y se bioacumuló en la cadena alimenticia acuática. En la bahía de Minamata se reportaron alteraciones neurológicas especialmente entre los pescadores y sus familias. Los pacientes presentaron alteraciones sensoriales en la parte distal de sus extremidades (parestesia en los pies y manos), seguidos de ataxia, constricción concéntrica bilateral de los campos visuales, sordera y deficiencia del habla. Temblores, movimiento anormal de los ojos y ocasionalmente desórdenes mentales, del gusto y el olfato. En casos severos de intoxicación, los pacientes se incapacitan y

mueren. Actualmente el síndrome causado por la intoxicación del metilmercurio se llama enfermedad de Minamata.

Los cambios histopatológicos asociados con la exposición al metilmercurio son relacionados predominantemente con el sistema nervioso, especialmente corteza cerebral, cerebelar y nervios sensoriales periféricos. Entre los pacientes de Minamata, los casos fatales agudos mostraron pérdida de neuronas con proliferación de células gliales, microcavitación, congestión vascular y edema en la corteza cerebral⁴⁰, mientras que los pacientes con inicio agudo y supervivencia prolongada tuvieron lesiones predominantemente en la calcarina y corteza cerebelosa. El cerebelo presentó lesiones características en la porción profunda, con pérdida de células granulares y sin embargo las células de Purkinje se conservaron.

Durante los brotes de intoxicación con metilmercurio en Japón se reportaron los primeros casos de intoxicación prenatal que describían los hallazgos patológicos en los cerebros de fetos ^{41,42}. En los cerebros prenatales se observan interrupción de la citoarquitectura, que indica mayor sensibilidad al metilmercurio (MeHg) que el cerebro adulto. Los síntomas a la exposición prenatal incluyen retardo mental, ataxia, espasticidad y ceguera. La alta exposición provoca severo retardo mental y muerte, mientras que la moderada se asocia con deterioro de las habilidades motoras. Adicionalmente se observó que inhibió la migración neuronal ⁴³.

Otro severo caso de intoxicación con metilmercurio ocurrió en Iraq en los inicios de la década de los setenta, cuando algunas semillas fueron tratadas con fungicidas que contenían metilmercurio, cuya consecuencia fue la intoxicación de cientos de personas, con 459 muertes ⁴⁴. La descripción de los síntomas y su patología eran similares a los reportados durante la intoxicación en la bahía de Minamata ⁴⁰.

En los últimos años, el hombre ha reducido considerablemente la contaminación con metilmercurio, debido a las mejoras en la industria y los esfuerzos para reducir al mínimo la liberación de mercurio al medio ambiente. Sin embargo, el mercurio sigue siendo un contaminante global y hay regiones en el mundo, especialmente en los países en desarrollo, donde los niveles de contaminación del medio ambiente siguen siendo altos.

Recientemente se reportó el consumo de pescado contaminado con metilmercurio (MeHg), entre los residentes de las villas pesqueras cercanas a minas de oro en la Amazonia de Brasil ⁴⁵.

En la Amazonia peruana se ha incrementado la minería artesanal e informal, existe la creciente preocupación por la extensa contaminación del medio ambiente con mercurio que se está produciendo en esta zona, especialmente en la región de Madre de Dios ⁴⁶⁻⁴⁷, ocasionando bioacumulación y biomagnificación del metilmercurio (MeHg). En Madre de Dios, se estima la población de 30 000 mineros artesanales ⁴⁶, sin embargo muchos estudios en realizados en esta región tienen importantes limitaciones de laboratorio, muchos no han calculado la

concentración de mercurio en orina y la mayoría no ha evaluado el metilmercurio en sangre ⁴⁸.

Ciertas áreas costeras del mar Mediterráneo tienen altos niveles de mercurio en peces y mariscos, posiblemente relacionados con la presencia de enormes depósitos de cinabrio ⁴⁹, consecuencia de la minería del oro ⁵⁰.

Algunos lagos y áreas costeras de Suecia y Finlandia también han sido contaminados, principalmente por la industria de los álcalis del cloro y el anterior uso del mercurio como perseverante de la pulpa y la industria del papel ⁵¹. Como medida preventiva, en Suecia se ha restringido el consumo de ciertos peces, especialmente en las mujeres en edad fértil. Para evitar la intoxicación en varios países se coloca la advertencia “peces contaminados” en los avisos de pesca ⁵².

Estudios realizados en Canadá así como en Nueva Zelanda han reportado efectos neurológicos en niños, debido a la exposición prenatal al metilmercurio (MeHg) ^{53,54}, observándose relación inversa entre la concentración de mercurio en los cabellos de las madres y el IQ de sus hijos. Recientemente estudios realizados en Granada y España, encuentran una relación entre los niveles de mercurio en los cabellos de niños menores a 4 años con el retraso del desarrollo neuronal. Una concentración de 1 ug/g de mercurio en el cabello se correlaciona con el decremento cognitivo general, memoria y habilidades verbales ⁵⁵.

2.2. MEMORIA Y APRENDIZAJE

La exposición a sustancias neurotóxicas como metilmercurio (MeHg) durante el desarrollo provoca daños morfológicos en el sistema nervioso y sus procesos, tales como el aprendizaje y la memoria.

2.2.1. BASES NEUROFISIOLOGICAS DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.

La memoria incluye el conjunto de estructuras y procesos cognitivos que permite registrar, codificar, consolidar, almacenar y recuperar la información. El aprendizaje y la memoria son procesos interdependientes y estrechamente ligados, por lo cual son inseparables. Se puede definir como dos momentos en la sucesión de procesos a través de los cuales los seres vivos adquieren y elaboran la información proporcionada por el medio en el que se encuentran y desarrollan ⁵⁶.

El aprendizaje es el proceso por el cual se adquieren conocimientos, habilidades o actitudes, por medio de la enseñanza o experiencia, este suceso genera un cambio persistente, medible y específico en el comportamiento de un individuo. El aprendizaje requiere necesariamente la adquisición de información por cualquier medio y por ende la modificación de la memoria (56).

La organización de la memoria y su estructura es compleja, por ende existen numerosas hipótesis, pero existe una organización básica admitida, que se grafica en la Fig. 2

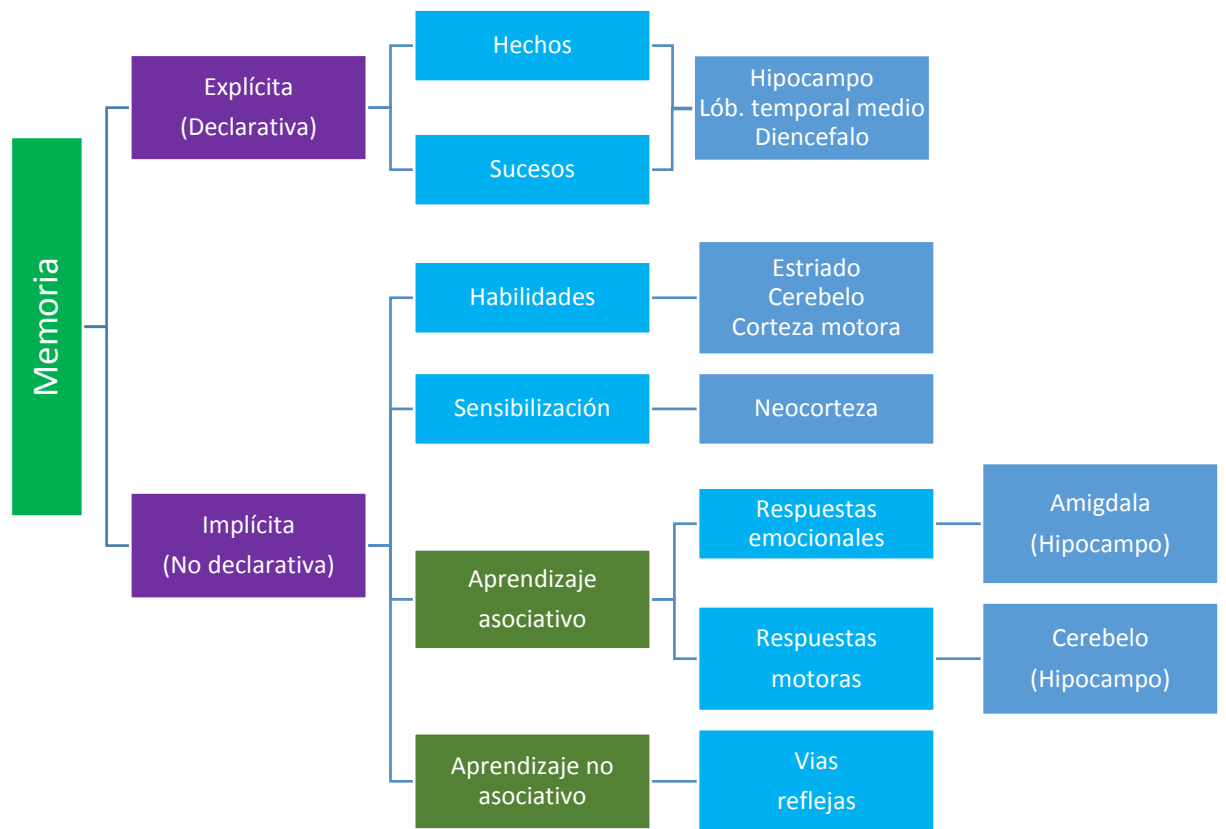


Fig 2. La memoria se divide según su función en dos tipos (Morado). Cada una requiere de un ingreso diferente durante el aprendizaje que da origen a diversos tipos de comportamiento (celeste) y se fundamenta en diferentes regiones neurales (azul) ⁵⁶.

Cada tipo de aprendizaje y memoria depende de un sustrato neural más o menos específico, cabe recalcar que los circuitos del sistema nerviosos están interconectados. El presente trabajo utiliza tareas cuyo principal sustrato es el cerebelo.

2.2.2. EL CEREBELO EN LOS PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA

El cerebelo está implicado en el aprendizaje de respuestas adquiridas por condicionamiento clásico. Se ha demostrado en observaciones clínicas que el cerebelo es el responsable de regular el movimiento coordinado y control motor ⁵⁷. Además de la regulación, el cerebelo posee un papel importante en el aprendizaje de las conductas motoras ⁵⁸, de igual manera está ligado a la memoria de trabajo y las memorias explícitas e implícita ⁵⁹. Además está implicado en algunas actividades cognitivas no motoras ⁶⁰.

2.2.3. ESTRUCTURA DEL CEREBELO.

El cerebelo posee un número mayor de neuronas que cualquier otra subdivisión del encéfalo, incluidos los hemisferios cerebrales. Sin embargo sus tipos neuronales son reducidos, por lo que sus circuitos son bien conocidos.

Las neuronas de la corteza cerebelosa están organizadas en tres capas: la más externa la *molecular*, contiene los cuerpos celulares de dos tipos de interneuronas inhibitoras, las células estrelladas y en cestillo, dispersas entre los axones excitatorios de las células granulares y las dendritas de las células de Purkinje.

Por debajo de la capa *molecular* se encuentra la capa de *Células de Purkinje*, que consta de una sola capa de cuerpos celulares. Estas neuronas tienen unos cuerpos grandes (50 – 80 um) y arborizaciones

detríticas en abanico que se extienden hacia arriba, a la capa *molecular*. Sus axones se dirigen a la sustancia blanca subyacente hasta los núcleos cerebelosos o vestibulares profundos y proporcionan las eferencias de la corteza cerebelosa. Estas señales son inhibitoras en su totalidad y están mediadas por el GABA.

La capa más interna, o *capa Granular* contiene un numero enorme (calculado en 10^{11}) de células granulares y unas pocas interneuronas de Golgi de mayor tamaño ⁵⁶. Las neuronas granulares, son la diana preferencial del Metilmercurio, al igual que otras sustancias neurotóxicas.

Ver fig. 3

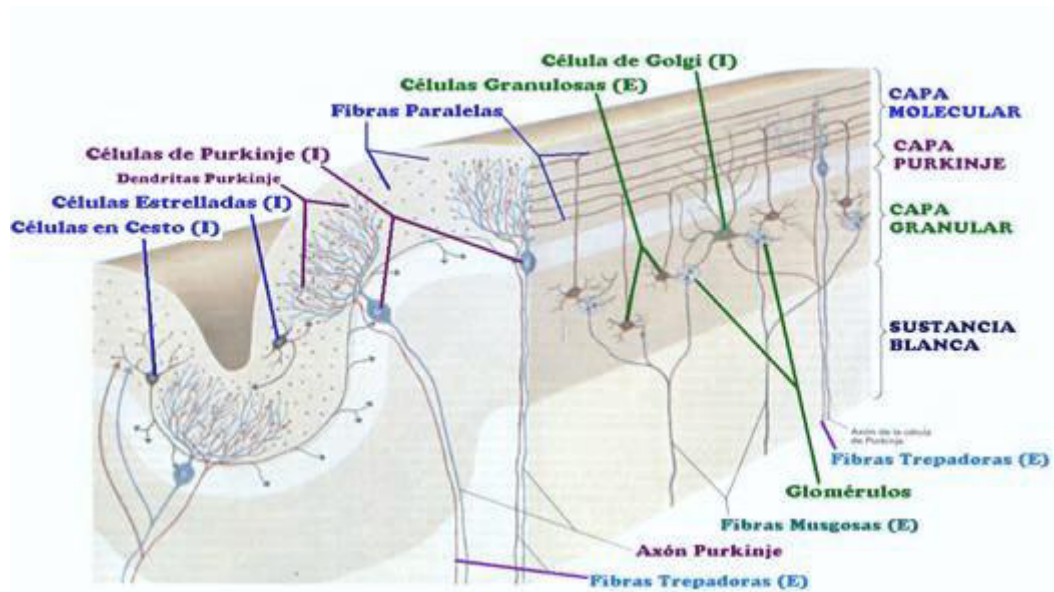


Fig. 3: Estructura del cerebelo

2.2.4. TEST DE APRENDIZAJE.

Los animales poseen un sistema de orientación espacial para sobrevivir, que les ayuda a encontrar fuentes de alimento y agua en determinados lugares. Para tal fin desarrollan estrategias de navegación que les permite localizar y memorizar el lugar donde se encuentra la comida y el agua. El proceso final es la construcción de mapas cognitivos del entorno interpretando la información sensorial obtenida durante la exploración.

En los roedores de laboratorio se puede investigar la orientación espacial utilizando diferentes tipos de test de aprendizaje que permiten estudiar los mecanismos de la memoria espacial. Los tests más utilizados son: el laberinto en T, el laberinto radial de ocho brazos, el laberinto acuático de Morris y el laberinto en forma de Y.

El laberinto en T evalúa la memoria espacial ⁶¹. El animal debe explorar el ambiente que lo rodea y aprender en que brazo está localizada la comida. Es similar a la tarea de discriminación condicional en el laberinto en Y. Es sensible a los efectos de lesiones en varias regiones del cerebro, particularmente en el hipocampo y a efectos ocasionados por toxinas que pueden mejorar o empeorar la memoria espacial. *Ver Fig. 4*

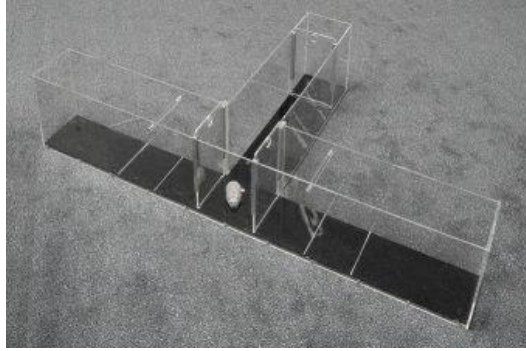


Fig. 4: Laberinto en T

En el laberinto radial de ocho brazos, la ejecución de la tarea requiere un tipo de memoria espacial cuyo sustrato es el hipocampo ⁶². Es un test sensible a la edad y al daño en esta área cerebral. Al inicio de cada ensayo se colocan pequeñas cantidades de comida al final de cada uno de los brazos y se permite al animal recorrer todo el laberinto hasta que consume la comida de cada uno de los ocho brazos. Con la práctica, los animales aprenden a obtener la comida con la menor cantidad de visitas posibles. El test requiere la habilidad de llevar un registro de los brazos visitados en cada ensayo (memoria de trabajo) para poder realizar futuras elecciones de brazos diferentes. *Fig. 5*

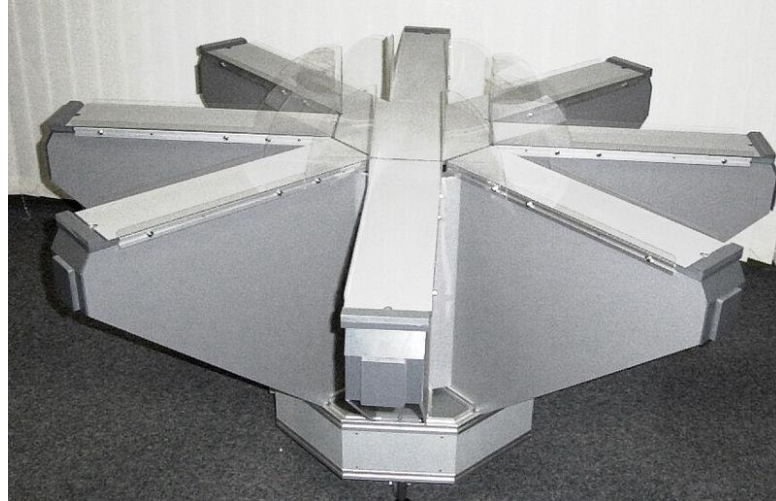


Fig. 5: Laberinto de ocho brazos

El laberinto acuático de Morris es el test más utilizado para investigar aspectos específicos de la memoria espacial ⁶³. En este ensayo el roedor se coloca en una piscina redonda de diámetro específico (1m para ratones y 2 m para ratas) en la que hay una plataforma escondida a pocos centímetros bajo la superficie del agua que el animal debe encontrar. En este caso el incentivo no es comida, sino el poder apoyarse y dejar de nadar. Con los sucesivos ensayos, deberá aprender donde se localiza la plataforma y nadar directamente a ella. Este test permite numerosas variantes de protocolo, por lo que es útil en el estudio de diversas alteraciones en el aprendizaje y es muy sensible a los efectos del envejecimiento. Fig. 6

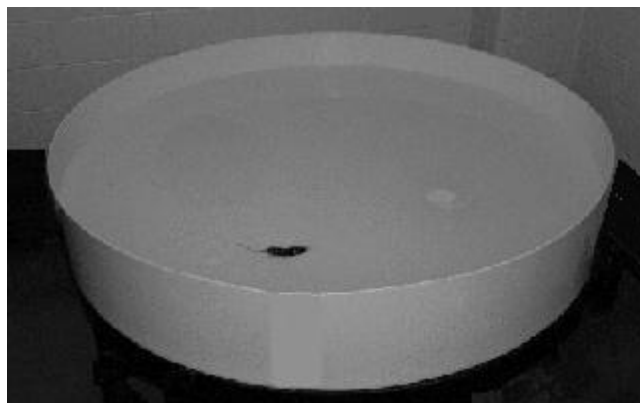


Fig. 6: Laberinto acuático de Morris

2.2.5. LABERINTO EN FORMA DE Y.

En el presente trabajo utilizamos el laberinto en Y como tarea discriminativa condicional visuoespacial, para evaluar los efectos neurotóxicos de la exposición prenatal y durante la lactancia al metilmercurio (MeHg) sobre la capacidad de aprendizaje.

Se realiza en un laberinto con forma de Y en el cual uno de los brazos es el de entrada donde se coloca al animal y los otros dos son los de elección, en función al color del laberinto (blanco o negro) la comida se coloca en uno u otro brazo. La finalidad del test es aprender la asociación del color de las paredes del laberinto y el brazo donde se coloca la comida. Es una tarea de discriminación por que el sujeto (la rata) aprende a desarrollar una estrategia para orientarse en su medio basada en un estímulo condicional (color de las paredes del laberinto) ⁶⁴.

Este test ha sido útil en la investigación de fármacos que reviertan las alteraciones cognitivas por ejemplo la hexanodiona, que es un neurotóxico ⁶⁵. Ver fig. 7



Fig. 7: Laberinto en Y de color negro.

2.3. ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos contienen una cadena de átomos de carbono o cadena hidrocarbonada, cuya variación en longitud está relacionada con las particularidades de estos ácidos. Un ácido graso está compuesto de un grupo metilo (CH_3 -) en un extremo de la cadena y un grupo carboxilo o ácido (COOH) al otro extremo ⁶⁶.

Los ácidos grasos constituyen principalmente las membranas celulares, las cuales son puertas de entrada y salida de las células, por donde se comunican e intercambian sustancias químicas y nutrientes. También son el centro de diferentes receptores sensibles a los mediadores celulares (como por ejemplo las prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos) los que son sintetizados de forma continua y poseen vida corta ^{66,67}.

Estas membranas están compuestas de una doble capa de fosfolípidos, glicolípidos de colesterol y de proteína. El tipo de los ácidos grasos (saturados o insaturados) determina la rigidez o fluidez de las membranas celulares, estas propiedades tienen la capacidad de modificar los intercambios fisiológicos ⁶⁶⁻⁶⁷.

2.3.1. ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES

Los ácidos grasos esenciales son los precursores de los ácidos grasos altamente insaturados o polinsaturados, PUFAs (del inglés Poly Unsaturated Fatty Acid). Los PUFAs modulan la expresión de genes que codifican las proteínas involucradas en la inflamación, metabolismo lipídico y la utilización de energía, modulando procesos involucrados en la inmunidad innata y adquirida ⁶⁸.

La estructura química de los PUFAs se determina de acuerdo a la familia a la que pertenecen los ácidos grasos de origen. La familia de n-6 deriva del ácido graso polinsaturado linoleico (LA) o ácido graso omega 6. La familia de PUFA n-3 deriva del ácido graso polinsaturado alfa linolénico (ALA) o ácido graso omega 3 ⁶⁹⁻⁷².

El ácido linoleico (LA) y ácido linoleico (LA) son ácidos grasos esenciales, ya que los animales carecen del sistema enzimático necesario para insertar un doble enlace antes del carbono 6 contando desde el extremo metilo, y por lo tanto no pueden producir los ácidos grasos esenciales, debiendo ser aportados por la dieta . En cambio en los cloroplastos de las plantas verdes, algas y fitoplancton, el ácido linoleico

(LA) puede ser largamente saturado en la posición n-6 para producir ácido linoleico (LA) ⁶⁹⁻⁷².

En el cuerpo de los animales, el ácido linoleico (LA) es elongado y desaturado para formar el ácido araquidónico (ARA), C20:4 n-6. El ácido alfa linolénico (ALA) emplea y compite por las mismas rutas metabólicas y enzimas para formar el ácido eicosapentaenoico (EPA), C20:5 n-3 ^{70,71 y 73}. En esta competición por las elongasas y desaturasas los ácidos grasos n-3 son usados como sustratos preferidos ⁷⁴.

El EPA será elongado a ácido docosapentaenoico (DPA), C22:5 n-3, para producir finalmente el ácido graso más largo y de mayor insaturación normalmente encontrado en las dietas, el docosahexaenoico (DHA), C22:6 n-3. El EPA y DHA son fisiológicamente los más importantes de la clase n-3, son acumulados en los fosfolípidos de las membranas celulares del cerebro, corazón y testículos principalmente ⁶⁹⁻⁷².

2.3.2. ÁCIDO GRASO OMEGA 3 A NIVEL CEREBRAL.

Los ácidos grasos omega-6 y omega-3 son esenciales para la estructura y función normal del SNC, pero son derivados de la dieta. Entre ellos, cuatro de ellos son particularmente importantes para el SNC: ácido dihomogamma linolénico (DGLA) y ácido araquidónico (AA) (omegas-6), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (omegas-3) ⁷⁵⁻⁷⁶.

Los ácidos grasos omega-3 son esenciales para mantener la fluidez de la membrana ⁷⁷, que a su vez afecta la adherencia de las células nerviosas, la orientación del axón, el mantenimiento de la sinapsis, la formación dendrítica, y la velocidad de neurotransmisión ⁷⁸.

Los omega-3 también son ligandos para los receptores retinoides X (RXR) en el cerebro, que desempeñan un papel crucial en el crecimiento y proliferación neuronal durante el desarrollo fetal y en la diferenciación morfológica de las neuronas catecolaminérgicas ^{79,80}.

Estructuralmente, AA y DHA son componentes clave de las membranas neuronales, que representan 15% -20% de la masa seca del cerebro y más de 30% de la retina. El AA es crucial para el crecimiento del cerebro, y las deficiencias leves están asociadas con el bajo peso al nacer y la reducción de la circunferencia de la cabeza, también juega un papel clave en los procesos celulares del aprendizaje y memoria. El DHA es fundamental de la estructura de la sinapsis, de los fotorreceptores y la neuroplasticidad, por lo que un abastecimiento adecuado es esencial para el normal desarrollo cognitivo y visual ⁸¹. Por lo antes mencionado el suministro adecuado de PUFAs es crucial para la función óptima del cerebro.

Tres PUFAs (DGLA, AA y EPA) son importantes como sustratos para los eicosanoides, un gran grupo de sustancias similares a las hormonas bioactivas incluyendo las prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, entre otros. Estos derivados desempeñan papel clave en regulación del flujo sanguíneo, sistemas hormonales, funcionamiento del

sistema inmune, y pueden modular los canales iónicos, la captación de neurotransmisores, transmisión sináptica, apoptosis y muchos otros procesos biológicos ⁸².

El DHA es el principal componente estructural de la corteza cerebral de los mamíferos, y comprende 50% de fosfolípidos ⁸³. Es el ácido graso más largo y más insaturados que se encuentra en las membranas biológicas, con una estructura que es tremendamente flexible y versátil ⁸⁴. Es capaz de experimentar interconversiones rápidas entre múltiples estados de torsión, y único en su capacidad para alterar significativamente el borde de membrana y su fluidez, además el comportamiento de fase, la compresibilidad elástica y la permeabilidad a los iones ⁸⁵⁻⁹⁰. No es sorprendente que este PUFA altamente adaptable sea particularmente abundante en las membranas que requieren la formación de vesículas y liberación rápida, tales como los segmentos externos de los bastones de la retina y la sinapsis ⁹¹. La capacidad neuronal del DHA, de someterse inmediatamente a estos complejos cambios que además requiere mínimos consumos conformacionales de energía, es característica y una de las razones principales por las que se piensa que es tan abundante en el cerebro ⁸⁵⁻⁸⁹.

En primer lugar, los niveles de estos ácidos grasos son muy bajos en las dietas modernas, sobre todo en las que predominan los alimentos procesados ⁹², la proporción de omega-6 y omega-3 en las dietas típicas occidentales se ha incrementado dramáticamente durante el siglo pasado, de aproximadamente 3:1 a casi 20:01, y esto se ha vinculado

explícitamente con el aumento de las tasas de muchos trastornos físicos y mentales ⁹².

La falta de omega-3 conduce a desequilibrios en la producción de eicosanoides, debido a que los derivados de prostaglandina, leucotrieno y tromboxano de AA y EPA generalmente poseen acciones opuestas. En particular, los derivados de AA promueven inflamación, mientras que los de la EPA tienen efectos antiinflamatorios, y la reactividad autoinmune anormal está cada vez más implicada en el desarrollo y trastornos psiquiátricos.

La creciente evidencia muestra que un equilibrio correcto entre los ácidos grasos omega-3 y omega-6 en las membranas celulares del cerebro es importante para la salud mental. La evidencia clínica indica que las dosis altas de ácidos grasos omega-3 (2 hasta 4 g al día) pueden mejorar los síntomas de varias condiciones psiquiátricas. Sin embargo, se requieren mayores datos para llegar a respuestas concluyentes en este tema. El DHA y AA juegan los papeles más importantes en la función nerviosa, son los más largos y altamente insaturados de las familias del omega-3 y omega-6 (El papel en la función de la membrana celular del DPA, ácido graso más largo de la familia del omega-6, aún no se determina).

La dieta occidental actual, no proporciona ácidos grasos omega-3 y omega-6 en la proporción deseada (1:4). En el Reino Unido y Europa Occidental, la proporción es tan baja como 1:15. Es importante que el

público, los dietistas, la profesión médica y los responsables políticos encargados de los programas de nutrición sean conscientes de esta recomendación y trabajen para asegurar una ingesta diaria de DHA – EPA, en niveles adecuados para la población ⁹³.

2.4. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la relación óxido-reducción intracelular, es decir el balance entre los componentes pro-oxidantes y antioxidantes. Este desbalance se debe a una excesiva producción de especies reactivas del oxígeno (EROS) y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo a daño celular, procesos que pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. Los radicales libres tienen una configuración electrónica de capas abiertas por lo que llevan al menos un electrón desapareado que es muy susceptible de crear un enlace con otro átomo o molécula.

El cerebro es particularmente susceptible al estrés oxidativo, por un lado, debido al alto contenido de ácidos grasos fácilmente oxidables, particularmente el DHA y ARA y sus requerimientos tienen alto consumo de glucosa, proceso que se encuentra asociado con la alta producción de radicales libres ⁹⁴.

2.4.1. AGENTES OXIDANTES (RADICALES LIBRES).

Se define como radicales libre a las moléculas, fragmentos moleculares o átomos que en su estructura atómica presentan uno o más electrones desapareados en el orbital más externo. La configuración presentada determina su inestabilidad, tiempo de vida muy corto, gran reactividad y enorme capacidad para reaccionar con otras sustancias captando y cediendo electrones para estabilizar su carga eléctrica y llegar al equilibrio electrónico. Los radicales libres pueden estar cargados positivamente, negativamente o ser eléctricamente neutros. Los radicales libres actúan alterando las membranas celulares y atacando el material genético de las células, como el ADN ⁹⁵.

El mecanismo más frecuente por el cual se originan los radicales libres en los organismos vivos es por la adición de un electrón a una molécula estable, siendo la fuente más importante las reacciones bioquímicas de óxido-reducción univalente con la intervención del oxígeno ⁹⁶.

a). ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROs)

El término especies reactivas del oxígeno (EROs) se refieren tanto a los radicales de oxígeno como a otras moléculas reactivas que tienen como centro reactivo al oxígeno.

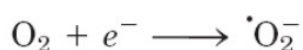
<i>Principales Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) ⁹⁷.</i>			
Radicales Libres		No Radicales	
• OH[•]	Radical Hidroxilo.	• ¹O₂	Oxígeno Singlete
• O₂⁻	Anión Superóxido.	• H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno.
• ROO[•]	Radical Peróxido.		

▪ **Radical hidroxilo.**

Los radicales hidroxilos (OH[•]) son altamente reactivos con fuerte potencial oxidante. Causan daño a las moléculas cercanas al lugar de su generación, y debido a su alta reactividad no son permeables a la membrana ⁹⁸.

▪ **Anión superóxido.**

El anión superóxido se forma principalmente como producto intermedio en las reacciones bioquímicas. Este anión está cargado negativamente, y es relativamente impermeable en la membrana.



Sin embargo, en comparación con otros radicales libres, el superóxido posee una vida media relativamente larga que permite la difusión dentro de la célula y por tanto, aumentar el número de sus posibles objetivos. En las células inflamatorias se producen cantidades relativamente grandes de superóxido como parte del proceso por el que se resiste a los organismos invasores ⁹⁸.

- **Oxígeno inglete.**

Es una forma de oxígeno excitado por vía electrónica y no es un radical, pues los electrones no están desapareados. Tiene una vida media muy corta, pero es capaz de difundir y es permeable a las membranas. No tiene restricción de giro, y su capacidad de oxidación es mayor ⁹⁹.

- **Peróxido de hidrógeno.**

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es un compuesto reactivo que puede fácilmente generar radicales libres como el radical hidroxilo en circunstancias específicas. Es estable, permeable a las membranas, y posee una vida media relativamente larga dentro de la célula, citotóxico, se considera un agente oxidante relativamente débil, no es capaz de oxidar el ADN o lípidos directamente, pero puede inactivar algunas enzimas ⁹⁸.

La citotoxicidad de peróxido de hidrógeno se debe principalmente a la capacidad de generar el radical hidroxilo a través de reacciones catalizadas por metales, como la reacción de Fenton.



- **Hiperclorito.**

Hiperclorito está formado por la acción de la enzima mieloperoxidasa (MPO) utilizando peróxido de hidrógeno;

predominantemente por neutrófilos y puede dañar las biomoléculas mediante la oxidación de tioles, lípidos, ascorbato, y NADPH con la generación de diversos productos secundarios. En su forma de ácido (ácido hipocloroso), este oxidante puede atravesar las membranas celulares y puede causar fragmentación y agregación de proteínas por reacciones múltiples ⁹⁸.



b). ESPECIES REACTIVAS DE NITROGENO (ERNs).

El término especies reactivas de nitrógeno (ERNs) se refiere a los radicales de nitrógeno y a otras moléculas reactivas que tienen como centro reactivo al nitrógeno.

Las principales ERNs son el óxido nítrico (NO.) y el peroxinitrito (ONOO⁻), que es considerado uno de los más potentes oxidante biológico. Las ERNs pueden dañar las células por distintos mecanismos: inactivación de los distintos complejos de la cadena respiratoria, daño a proteínas y a lípidos e inhibición de síntesis proteica o de ADN ¹⁰⁰.

2.4.2. OXIDACIÓN DE PROTEINAS.

Las proteínas son modificadas de diferentes maneras por las EROs. Por la reactividad con moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones aminoácidas mediadas por radicales libres.

En este sentido, se ha observado una inhibición de las enzimas que dependen de estos aminoácidos para presentar actividad. Las reacciones de los radicales libres con estos aminoácidos dan lugar también a alteraciones estructurales en las proteínas provocando entrecruzamiento y fenómenos de agregación que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermolecular ¹⁰¹.

2.4.3. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La peroxidación lipídica hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. A través de este proceso los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares. El proceso es iniciado por un mecanismo de reacción en cadena de un radical libre. Tras la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de las membranas biológicas se generan, entre otros, malonildialdehído (MDA) e hidroxialqueno (4-HNE), como productos finales de la reacción. Gracias a

su determinación se puede cuantificar la peroxidación lipídica y, el estrés oxidativo en los organismos.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) son fundamentales para la célula, forman parte de los fosfolípidos, constituyentes principales de la bicapa lipídica de las membranas y son responsables de la fluidez de ésta. La función de estos lípidos localizados en las membranas biológicas es mantener su integridad. Entre los lugares en los que se pueden encontrar los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) destacan la membrana plasmática, la membrana celular del retículo endoplasmático y la membrana mitocondrial.

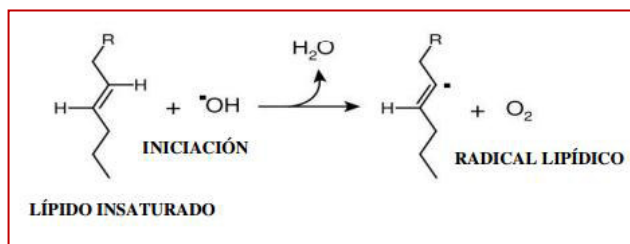
Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son las moléculas biológicas más susceptibles al estrés oxidativo. Esta peroxidación es el efecto más importante de los radicales libres sobre la célula, ya que la destrucción de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana junto con la formación de puentes disulfuro en las cadenas proteicas y la ruptura de éstas, provoca un desmoronamiento de la estructura de membrana que conduce a una pérdida de permeabilidad y, posteriormente, a la muerte celular.

Al igual que cualquier reacción con radicales, ésta consiste en tres pasos fundamentales: iniciación, propagación y terminación. Son

reacciones dañinas, que provocan la formación de distintas especies afines, que a su vez tienen la capacidad de degradar membranas.

a). INICIACIÓN.

La iniciación es el paso en donde el radical de ácido graso es producido. Los iniciadores en células vivas más notables son las especies reactivas del oxígeno, tales como OH^\bullet , el cual combina con un hidrógeno para dar lugar a agua y a un radical lipídico.

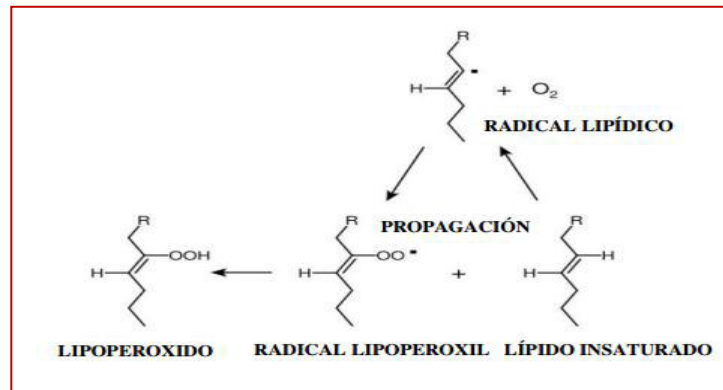


El radical se une con el ácido graso, en este caso sería la cola de un fosfolípido en el cual se encuentra un lípido insaturado, un radical OH^\bullet se une a este para formar agua y un radical del lípido, cambia la estructura de la capa alterando la permeabilidad.

b). PROPAGACIÓN.

El radical lipídico no es una molécula estable, de modo que reacciona rápidamente con oxígeno molecular, creando de este modo un radical ácido graso peroxil. Es una especie muy inestable, por lo cual reacciona con otro ácido graso dando lugar a un ácido graso radical diferente y a un lipoperóxido o un peróxido cíclico si ha reaccionado consigo mismo. Este

ciclo continúa ya que el nuevo radical lipídico se comporta de la misma manera.



En este paso el radical lipídico es muy inestable se une con oxígeno molecular creando un radical ácido peroxy-lipídico, especie inestable que reacciona con el ácido graso de otro fosfolípido (lípido insaturado). Como consecuencia, genera un nuevo radical lipídico, provocando una secuencia en cadena, que se conoce como estrés oxidativo.

c). TERMINACIÓN.

Cuando un radical reacciona, siempre produce otro radical, es por ello que se trata de un mecanismo de reacción en cadena. La reacción radical se detendrá cuando dos radicales reaccionan y producen una especie no radical. Esto ocurre solamente cuando la concentración de especies radicales es lo suficientemente alta como para que exista la probabilidad de que se encuentren dos radicales. Los organismos han evolucionado diferentes moléculas que aceleran el proceso de

terminación atrapando radicales libres, protegiendo de esta manera la membrana celular. Uno de estos importantes antioxidantes es la vitamina E, otros antioxidantes de importancia incluyen las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa ¹⁰².

2.4.4. MECANISMOS DE PROTECCIÓN.

Los mecanismos preventivos, secuestradores y reparadores de este deterioro oxidativo, comprende principalmente a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidada (GPx), compuestos antioxidantes endógenos.

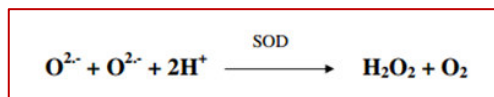
Las enzimas antioxidantes catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los radicales libres. Dentro de las ventajas asociados a las enzimas, es que su actividad puede ser regulada en relación a los requerimientos celulares, es decir se encuentra modulada por factores endógenos ¹⁰³.

a). ENZIMAS ANTIOXIDANTES.

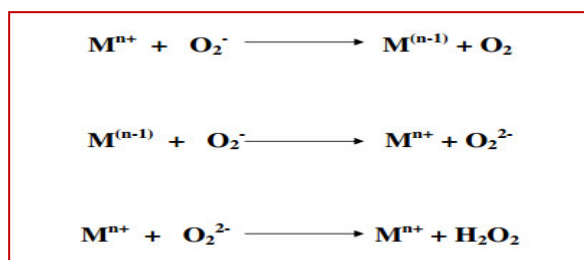
Las principales enzimas antioxidantes incluyen la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y catalasa. Enzimas antioxidantes adicionales como; La peroxirredoxina, glutaredoxina, y tioredoxina reductasa también contribuyen a la protección contra la oxidación celular.

▪ SUPERÓXIDO DISMUTASA.

La enzima superóxido dismutasa (SOD) fue descubierta en 1969 por McCord y Fridovich y constituye la primera línea de defensa contra los radicales superóxido.



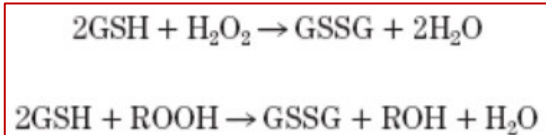
La dismutación de los radicales superóxido produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2). El mecanismo de dismutación se describe a continuación.



En los mamíferos existen tres isoformas de SOD (SOD1, SOD2, SOD3), y todas ellas requieren un metal de transición en el sitio activo para lograr la ruptura catalítica del anión superóxido. SOD1 requiere de cobre-cinc como cofactor y se localiza principalmente en el citosol y el espacio intermembrana mitocondrial. SOD2, Mn-SOD, utiliza manganeso como cofactor y se encuentra en la matriz mitocondrial. Por último, SOD3 requiere de cobre-cinc como cofactor y se encuentra en el espacio extracelular ⁹⁸.

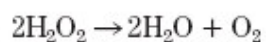
▪ **GLUTATION PEROXIDASA.**

Se han identificado cinco peroxidasas de glutatión en los mamíferos (GPX1-GPX5). Todas las enzimas GPX catalizan la reducción de H_2O_2 o hidroperóxido orgánico (ROOH) a agua (H_2O) y alcohol (ROH) respectivamente, utilizando el glutatión reducido (GSH), o en algunos casos, tioredoxina glutaredoxina como donador de electrones. Cuando GSH es el principal donador de electrones, dona un par de iones de hidrógeno y es oxidado a glutatión disulfuro (GSSG) de la siguiente manera:



▪ **CATALASA.**

La catalasa es la enzima encargada de la descomposición de peróxido de hidrógeno en H_2O y O_2 de acuerdo a la siguiente reacción:



Esta principalmente localizada en los peroxisomas o microperoxisomes. El hierro es un cofactor necesario ubicado en el sitio activo de la enzima. Aunque CAT y GPX tienen sustratos comunes, CAT tiene una afinidad mucho más baja para H_2O_2 en bajas concentraciones en comparación con GPX⁹⁸.

b). ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS.

La segunda defensa antioxidante corresponde a los antioxidantes no enzimáticos que actúan tanto a nivel celular como extracelular. Son pequeñas moléculas que limpian el plasma de oxiradicales. Capturan los radicales libres impidiendo la reacción en cadena y otros reparan las células dañadas.

Funcionan cuando los sistemas enzimáticos antioxidantes quedan desbordados; estos sistemas se denominan captadores de radicales libres y son capaces de frenar las reacciones de oxidación.

Estas sustancias ceden un electrón, previniendo así el daño oxidativo. Al hacer esto se consumen porque el antioxidante sufre una modificación química transformándose en un radical libre flojo o inactivo. Por lo tanto, a diferencia de las enzimas antioxidantes, estos compuestos antioxidantes deben ser reemplazados.

Existen antioxidantes no enzimáticos:

- **De origen endógeno**, Son sintetizados por el organismo como glutatión, urato, y ubiquinol.
- **De origen exógeno**, provienen de la dieta, como vitamina C, vitamina E, carotenoides, polifenoles y flavonoides, al no ser sintetizados por las células, para ser reemplazados necesitan ser nuevamente

ingeridos en la dieta. La vitamina E y el β -caroteno protegen a las membranas celulares del daño de los radicales. La vitamina C trabaja en conjunto con la vitamina E para proteger tanto a las sustancias lipídicas como a las proteínas de las células del daño de los radicales

98.

2.5. *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.

La Amazonía está considerada como el más importante centro de biodiversidad en el mundo. Muchos cultivos importantes para la agricultura (como la yuca, la piña, el cacao y el caucho) fueron domesticados en esta área, un típico ejemplo de estas especies es la *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Ver Fig. 8



Fig. 8: Plukenetia volubilis L.

Conocido también como “maní del inca”, “maní peruano”, “maní silvestre” o “maní del monte”, el Sacha inchi es una *Euphorbiaceae*, cuyo

género *Plukenetia* comprende 17 especies de distribución pantropical, 12 en América, 03 en África, 01 en Madagascar y 01 en Asia ¹⁰⁷.

Está distribuida en el trópico latinoamericano y en el Perú se ha recolectado en Madre de Dios, Huánuco, San Martín, Ucayali, Iquitos, y áreas del estrecho amazónico. Crece desde los 100 msnm hasta 1500 msnm ^{104, 108}.

Plukenetia volubilis L. “sacha inchi” tiene relativamente alto contenido proteico (27 - 30%), rico en cisteína, tirosina, treonina y triptófano ^{104-106,109}.

El perfil de los aminoácidos fue comparable al de otras oleaginosas, sin embargo los niveles de lisina y leucina fueron más bajos que aquellos de la proteína de soya, aunque iguales o mejores que los niveles de proteína en el maní, algodón o girasol. El total de los aminoácidos esenciales fue comparable o mayor que esos de otras fuentes proteicas ¹⁰⁹.

La composición de los ácidos grasos del aceite crudo determinada por cromatografía de gases reveló un alto grado de insaturación, destacándose el ALA con 43.8%, seguido del LA con 37%. El total de ácidos grasos saturados asciende al 9% como se observa en el cuadro 1 y 2 ¹⁰⁸.

Tabla 1. Composición química porcentual de la semilla de *Plukenetia Volubilis* L. “sacha inchi” en base seca y húmeda

	SEMILLA	
Componente	Base Húmeda	Base Seca
Humedad	6.40%	0.00%
Proteína Total	24.30%	25.90%
Grasa Cruda	51.40%	54.90%
Carbohidratos	4.03%	4.30%
Ceniza	2.70%	2.90%
Fibra Cruda	11.30%	12.07%

Tabla 2.

Composición química porcentual de los ácidos grasos del Aceite de *Plukenetia Volubilis* L. “sacha inchi”.

Ácido graso	% Aceite <i>Plukenetia Volubilis</i> L.
Mirístico (14:0)	1.24
Palmítico (16:0)	5.61
Esteárico (18:0)	2.23
Oleico (18:1)	9.6
Linoleico (18:2)	36.99
Linolénico (18:3)	43.75
Total Saturados	9.08
Total Monoinsaturados	9.6
Total Polinsaturados	80.74

El aceite de *Plukenetia Volubilis* L. “sacha inchi” y el de linaza contienen similar cantidad de ALA, siendo fuentes importantes de PUFA n-3, además el sacha inchi contiene alto porcentaje de LA y menor de grasas saturadas ¹⁰⁴.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

Todas las abreviaturas y signos que aparecen a lo largo del siguiente apartado se encuentran explicadas en la lista correspondiente al inicio de la tesis.

3.1.1. REACTIVOS.

- Cloruro de metilmercurio (Sigma).
- DMSO (Sigma).
- Albúmina (Sigma).
- Suero fisiológico 9%
- Aceite de *Plukenetia volubilis* L. "Sacha inchi", donado por la empresa 3QP. Lt:100413.

3.1.2. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron ratas hembra Holtzman, adquiridas en el Instituto Nacional de Salud (INS-Chorrillos). Todos los animales fueron criados en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM; a temperatura controlada (22 ± 2 °C), humedad relativa ($60 \pm 10\%$) y ciclos de luz-oscuridad de 12 H cada uno, con libre acceso a la comida.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se distribuyeron aleatoriamente 36 ratas preñadas en cinco grupos, con la finalidad de evaluar el efecto neuroprotector del aceite de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi) en la neurotoxicidad inducida por metilmercurio.

3.2.1. IDENTIFICACIÓN DEL CICLO ESTRAL DE LAS RATAS.

Se realizó frotis del lavado vaginal de las ratas, las que se encontraron en la fase estro se colocaron en una jaula con un macho (tres ratas en fase estro con un macho), durante toda una noche, considerando la mañana siguiente como día cero de gestación. Cada una de ellas se alojó en jaulas individuales durante la gestación y lactancia.

3.2.2. FORMACIÓN DE GRUPOS.

Al séptimo día de gestación (GD7) las hembras preñadas se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos y se inició la administración del neurotóxico metilmercurio en forma de sal (cloruro de metilmercurio) y el neuroprotector (aceite de *Plukenetia volubilis* L.), finalizando la administración el día del destete (21 días postnatal o PND21).

- **Grupo N°1:** se administró DMSO disuelto en agua de bebida.
- **Grupo N°2:** se administró DMSO disuelto en agua de bebida y 2 mL/Kg/día de aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.

- **Grupo N°3:** se administró cloruro de metilmercurio (MeHgCl) a una dosis de 0,75 mg/Kg/día disuelto en DMSO y agua de bebida, además 2 mL/Kg/día de aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.
- **Grupo N°4:** se administró cloruro de metilmercurio (MeHgCl) a una dosis de 0,75 mg/Kg/día disuelto en DMSO y agua de bebida, además 4 mL/Kg/día de aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.
- **Grupo N°5:** se administró cloruro de metilmercurio (MeHgCl) a una dosis de 0,75 mg/Kg/día disuelto en DMSO y agua de bebida.

3.2.3. ADMINISTRACIÓN POR VÍA ORAL DEL CLORURO DE METILMERCURIO (MeHgCl)

A las ratas preñadas de los grupos N°3, N°4 y N°5 se les administró metilmercurio en forma de sal (cloruro de metilmercurio) disuelto DMSO puro a una dosis diaria de 0.75 mg/ Kg peso, diluido en agua de bebida. La concentración de cloruro de metilmercurio se ajustó en función al peso del animal y su consumo diario de agua, que puede variar entre 40 y 60 mL, durante la etapa de gestación y lactancia. Los animales del grupo N°1 y N°2 recibieron DMSO (vehículo) mezclado en agua de bebida, en cantidad equivalente al volumen administrado a las hembras tratadas con metilmercurio (aproximadamente 50 uL/kg/día).

3.2.4. ADMINISTRACIÓN POR VÍA OROGÁSTRICA DEL ACEITE DE *Plukenetia volubilis* L “Sacha Inchi”

A las ratas preñadas del grupo N°2, N°3 y N°4 se les administró aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” a una dosis de 2 mL/Kg/día para el

grupo N°2 y N°3. Al grupo N°4 se le administro 4mL/Kg/día. Para tal fin se utilizó una cánula de acero N°2.

3.2.5. SEPARACIÓN DE LAS CAMADAS.

Las crías destetadas fueron separadas en jaulas por sexo y camada hasta los tres meses, a partir de este día se iniciaron los análisis histológicos, bioquímicos y el test de aprendizaje (laberinto en forma de Y).

3.3. TEST DE APRENDIZAJE: DISCRIMINACIÓN CONDICIONAL EN UN LABERINTO EN Y.

El test de aprendizaje se realiza en dos laberintos de madera con tres brazos idénticos en forma y longitud (60 cm de largo, 11.5 cm de ancho y 25 cm de alto), colocados en forma de Y. Uno de los brazos se elige como brazo de salida y los otros dos son los brazos de elección. El color de las paredes y el piso son de color negro para un laberinto y blanco para el otro.

En función del color, el refuerzo (pellets de comida), se colocara al final del brazo derecho o del izquierdo. Cada ensayo en este test consta de la colocación de la rata en el brazo de salida y esperar su elección de brazo izquierdo o derecho, tras lo cual encontrará el refuerzo o no según haya acertado la asociación entre el color y el brazo donde se coloca el refuerzo.

3.3.1. PROTOCOLO.

Un día antes del comienzo de la habituación, reducir la comida diaria en un 10-15 %, aunque siempre dependerá de las condiciones (peso, tratamiento, edad, etc.) particulares de cada animal.

3.3.1.1. HABITUACIÓN.

Las crías con tres meses de edad son habituadas al experimentador, al lugar de trabajo y a los laberintos.

1º Día: Cada animal es colocado en el laberinto blanco o negro con pellets de refuerzo esparcidos por toda la superficie, durante 10 minutos.

2º Día: En las mismas condiciones que el día 1, pero en el laberinto de otro color.

3º Día: Colocar los pellets en un plato pequeño, el cual se ubica en el extremo del brazo derecho del laberinto blanco y en el brazo contrario se coloca un plato vacío.

4º Día: Colocar los pellets en un plato pequeño, el cual se coloca en el extremo brazo izquierdo del laberinto negro y en el brazo contrario se coloca un plato vacío.

Se asocia el color del laberinto a la posición del refuerzo en uno de los brazos de salida. La prueba consiste en aprender dicha asociación.

El laberinto negro siempre presentará el refuerzo en el brazo izquierdo, y en el laberinto blanco en el brazo derecho. Los días de test sólo se colocan de 2 a 3 pellets de refuerzo en el plato pequeño. En el brazo de la elección equivocada debe haber el mismo tipo de plato pero vacío.

Para evaluar el aprendizaje se coloca al animal al final del brazo de entrada, se considera correcto cuando se dirige al brazo que tiene el refuerzo y se considera error entrar en un brazo sin refuerzo. El laberinto se mantiene en la misma posición durante todo el experimento.

3.3.1.2. TEST

Los animales de experimentación realizan 5 visitas a cada uno de los laberintos, siguiendo una secuencia de alternancia. Existen dos secuencias de visitas, una para los días pares y otra para los impares. Se diferencian en el primer laberinto de la secuencia. El test se realiza hasta que un animal realiza una sesión diaria sin errores y se les asigna un puntaje de acuerdo a los días que demora en aprender la secuencia, por ejemplo si demora 5 días se le asignará un puntaje de 50.

Si el animal no aprende la secuencia en un máximo de 25 días se le asignará un puntaje de 250.

Para el análisis de resultados se debe tener consideración que mientras más alto el puntaje menor será la capacidad de aprendizaje y mientras más bajo sea el puntaje mayor será la capacidad de aprendizaje.

3.4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.

Las crías con tres meses de edad fueron sacrificadas por decapitación e inmediatamente se procedió a retirar los cerebros por la parte occipital del cráneo, el cerebelo se fija en solución de formol ácido y parafinado, posteriormente se cortaron en láminas de 5 μ m con la ayuda de un micrótopo, y fueron sometidas a la tinción Hematoxilina–Eosina (HiE).

Las láminas se incubaron por 5 minutos en hematoxilina de Harris (Sigma) prefiltrada antes de cada uso, y se viraron en agua corriente. Se diferenciaron en alcohol acidificado, hasta llegar a la coloración roja, se remojo en agua ligeramente básica hasta recuperar el color azul, se volvió a verter en agua corriente, posteriormente se encubaron por 2 minutos con eosina Y (sigma), se deshidrataron con etanol y finalmente se montaron para su posterior análisis.

La tinción HiE, no es un colorante básico, al ser utilizado como intermediario, da lugar a la coloración básica de las anilinas. Este colorante interacciona con los grupos fosfatos de ADN y ARN por lo que colorea la heterocromatina, los nucléolos del núcleo y regiones ácidas del citoplasma. La eosina es una anilina ácida que reacciona con los grupos catiónicos, como los grupos amino ionizados de proteínas tiñen las regiones básicas del citoplasma, filamentos citoplasmáticos y fibras extracelulares, finalmente se montaron para su análisis.

El análisis se realizó en el Instituto de Patología de la Facultad de Medicina de la UNMSM, las láminas se observaron en un microscopio trinocular. Se analizaron los daños y/o anomalías morfológicas ocurridas en la capa granular y células de Purkinje a un aumento de 20 y 40X.

Se determinaron cuatro estados: células con características normales, granulosa adelgazada, células de Purkinje disminuidas y disminución de la capa granulosa y Purkinje.

3.5. ANÁLISIS BIOQUÍMICO

3.5.1. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

Las crías con tres meses de edad fueron sacrificadas por decapitación e inmediatamente se procedió a retirar los cerebros por la parte occipital del cráneo, los mismos que fueron lavados con solución de Cloruro de Sodio 0,9% e inmediatamente colocados en bolsas de polietileno previamente identificadas. Las muestras se congelaron inmediatamente en mezcla de hielo seco con metanol (-70°C) ¹¹⁰.

3.5.2. PREPARACIÓN DEL HOMOGENIZADO.

El homogenizado se preparó cogiendo el 10 % del cerebro en solución buffer fosfato 0.05M pH 7,4 todo esto a 4°C utilizando un homogenizador. Se centrifugó a 2000 RPM, durante 5 minutos, y el sobrenadante fue utilizado para los ensayos bioquímicos ¹¹¹. Una porción fue separada para análisis de malonaldehído y otra para la cuantificación de proteínas.

3.5.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE MALONDIALDEHÍDO (MDA).

Es un método indirecto, que detecta los productos de la degradación de los lípidos (aldehídos como el MDA).

3.5.3.1. REACTIVOS

- Reactivo antioxidante: disolución de 2,5 g/L de butil-hidroxi-tolueno (BHT) en etanol.
- NaOH 10 N.
- Reactivo cromógeno de ácido tiobarbitúrico (TBA).- Sol.TCA/TBA/HCl: 15% w/v de TCA / 0.375 % w/v TBA / 0.25 N HCl. Calentar para favorecer la disolución del TBA.

El contenido de MDA fue determinado como sustancias reactivas del ácido tiobarbiturico (TBARs) mediante el método espectrofotométrico descrito por Buege y Aust.¹¹²

El método se basa en la reacción de una molécula de malondialdehído (MDA) con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA); formando un aducto MDA-TBA₂ estable y cuya coloración varía desde el color rosa al color rojo y que absorbe fuertemente a 532 nm. Ver Fig. 9

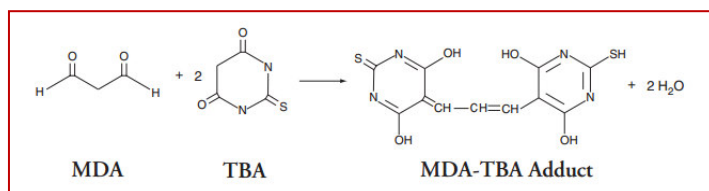


Fig. 9: Reacción del MDA con el TBA

3.5.3.2. MÉTODO OPERATORIO

Se midió 0,5mL de homogenizado al cual se le agregó 0,05mL de BTH 0,2% y 25 uL de NaOH 10N. Se incubó en Baño María a 60 °C por 30 minutos , enfriándose con hielo. Luego se agregó 2mL del reactivo cromógeno de ácido tiobarbitúrico (TBA). Se llevó a Baño María a 95 °C por 30 minutos enfriándose con hielo y finalmente se centrifugo a 4000 rpm por 20 minutos, leyendo el sobrenadante por espectrofotometría a 532 nm. Para el blanco, se realizó el mismo procedimiento con solución buffer fosfato 0.05M pH 7,4 en vez de muestra. Ver tabla 1.

TABLA 1

MALONDIALDEHIDO		
	BLANCO	MP
Homogenizado	----	0.500 mL
Buffer fosfato	0.500 mL	
BTH 0.2 %	0.050 mL	0.050 mL
NaOH10 N	0.025 mL	0.025 mL
	BM a 60 °C x 30 min.	
TCA/TBA/HCl	2.000 mL	2.000 mL
	Mezclar. Hervir a 95 °C x 30 min. Enfriar en hielo. Centrifugar a 4000 rpm x 20 min. Leer el sobrenadante a 532 nm	

Cálculos:

- Coeficiente de extinción molar: $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
- AbsMp: absorbancia de la muestra problema.
- Vt: Volumen total del tubo de ensayo.
- Vmp: Volumen de la muestra problema.

$$C_{\text{nmol/mg proteína}} = \frac{\text{Abs mp} \times V_t}{1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times V_{\text{mp}} \times \text{mg proteína}}$$

3.5.4. DETERMINACION DE PROTEINAS: METODO DE BRADFORD

3.5.4.1. REACTIVOS.

- Reactivo de Bradford (“muy importante”. No confundir el Coomasie G-250 con el Coomasie R-250). Ver tabla 2.

TABLA 2

Azul de Coomasie G-250	5 mg
Etanol	2.5 mL
Ac. fosfórico	5 mL
Agua	C.S.P. 50 mL
Mezclar en el orden indicado, disolver con agitación y a continuación filtrar.	

- Patrón de albúmina. 30 mg/dl.

Para la determinación de proteínas se realizó el método de Bradford, que se fundamenta en la formación de un complejo entre el reactivo azul de Coomasie y las proteínas en solución, cuantificando el cambio en el máximo de absorción a 595nm.

3.5.4.2. MÉTODO OPERATORIO.

Para la realización de la curva estándar se utilizó cantidades diferentes (0.0125mL, 0.025mL, 0.05mL, 0.075, 0.1mL) de albumina bovina (30 mg/dL) y se mezclaron con 1mL de Bradford, se dejó en reposo por 2 min y se leyó por espectrofotometría a 595 nm.

Para las muestra se cogió 10uL de homogenizado y se le añadió 1mL del reactivo de Bradford, se dejó en reposo por 2 min y se leyó por espectrofotometría a 595 nm ¹¹³

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis de datos se utilizó el programa estadístico SPSS versión 15, los resultados obtenidos de los grupos de estudios se expresan como medias y desviaciones estándar (SD). Se aplicó la prueba ANOVA. Todo resultado cuyo valor asociado de p sea menor que 0.05 se considera estadísticamente significativo.

IV. RESULTADOS

Para analizar los resultados se detallan nuevamente los grupos:

- **Grupo N°1:** se administró DMSO disuelto en agua de bebida.
- **Grupo N°2:** se administró DMSO disuelto en agua de bebida y 2 mL/Kg/día de aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.
- **Grupo N°3:** se administró cloruro de metilmercurio (MeHgCl) a una dosis de 0,75 mg/Kg/día disuelto en DMSO y agua de bebida, además 2 mL/Kg/día de aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.
- **Grupo N°4:** se administró cloruro de metilmercurio (MeHgCl) a una dosis de 0,75 mg/Kg/día disuelto en DMSO y agua de bebida, además 4 mL/Kg/día de aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.
- **Grupo N°5:** se administró cloruro de metilmercurio (MeHgCl) a una dosis de 0,75 mg/Kg/día disuelto en DMSO y agua de bebida.

4.1. TEST DE LABERINTO EN Y.

Se estudió la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y, según lo descrito en el apartado 3.3., para ratas de tres meses de edad. Los resultados se muestran en la tabla y figura N° 1

TABLA N°1

Efecto de la dieta del aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” sobre la capacidad de aprendizaje en ratas crías expuestas al metilmercurio en periodo de gestación y lactancia utilizando el Test del Laberinto de Y.

	N	MEDIA	DS	ANOVA	PRUEBA DE TUKEY				
					Grupo N°1	Grupo N°2	Grupo N°3	Grupo N°4	Grupo N°5
Grupo N°1	18	50	3.4	p=0.0000*	-	-	-	-	p=0.0000*
Grupo N°2	18	50.6	8		-	-	-	-	p=0.0000*
Grupo N°3	18	55.6	7		-	-	-	-	p=0.0000*
Grupo N°4	18	56.1	11.4		-	-	-	-	p=0.0000*
Grupo N°5	18	84.4	5.1		-	-	-	-	-

**P<0.05 existe diferencias significativas; se aplicó la prueba ANOVA

* P<0.05 existe diferencias significativas; se aplicó Prueba de Tukey

De la tabla se aprecia que la media sobre los ensayos necesarios para aprender en el grupo N°1 es 50 ± 3.4 , en el grupo N°2 es 50.6 ± 8.0 , en el grupo N°3 es 55.6 ± 7.0 , en el grupo N° 4 es 56.1 ± 11.4 y en el grupo N°5 es 84.4 ± 5.1 . Asimismo se observa que el grupo N°5 presenta menor

capacidad de aprendizaje, el valor es estadísticamente significativa $p < 0.05$ en relación a los grupos N°1, N°2, N°3 y N°4.

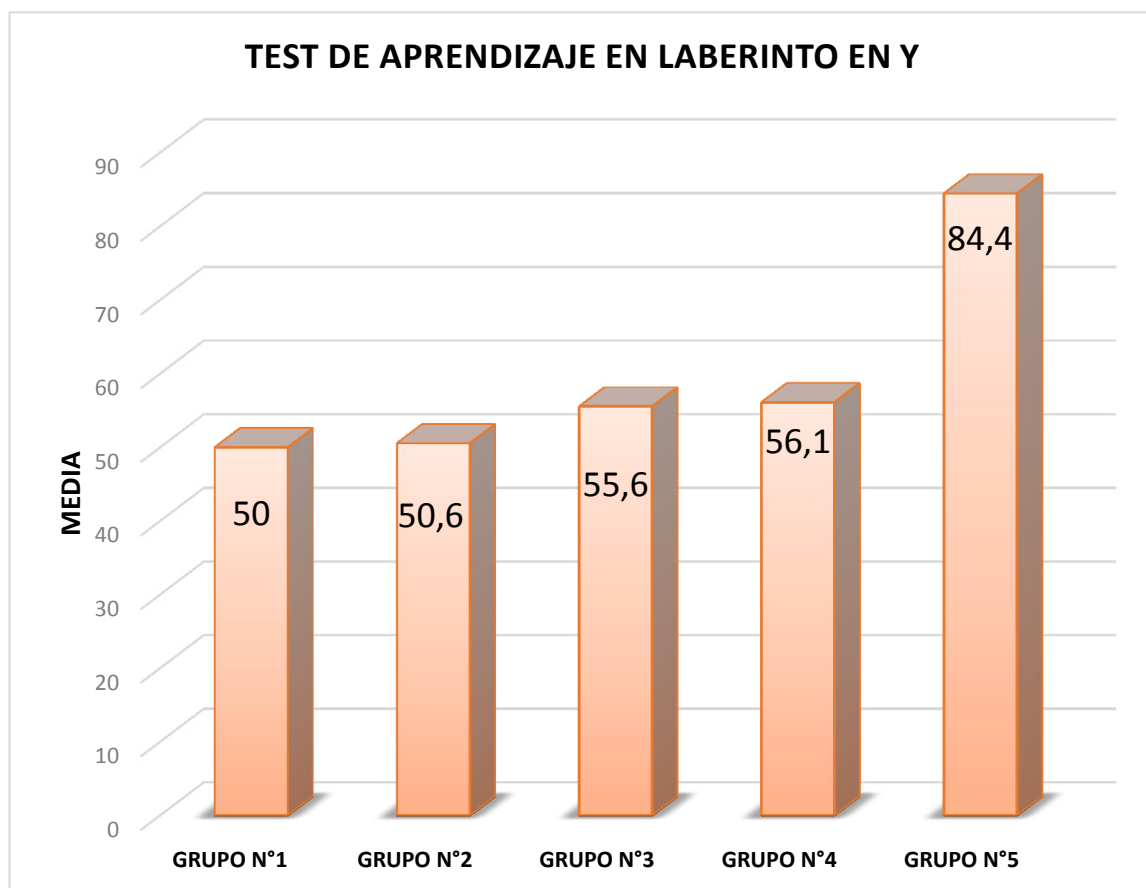


FIGURA N°1: Resultados del test de laberinto en Y.

De la tabla y la figura N° 1 e puede deducir que el grupo N°5 tiene mayor puntaje, por consiguiente menor capacidad de aprendizaje, con respecto a los demás grupos y esta diferencia es estadísticamente significativa.

La media de los grupos N°1, N°2, N°3 y N°4 no tienen diferencia estadísticamente significativa entre ellos, por lo cual se puede inferir que

la capacidad de aprendizaje en estos grupos es similar, a pesar que los grupos N°3 y N°4, son intoxicados con Metilmercurio, lo cual indica que la dieta suplementada con aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” ayuda a conservar la capacidad de aprendizaje, contrarrestando los daños ocasionados por la intoxicación del metilmercurio, como se observa en el grupo N°5 que no tuvieron una dieta suplementada con aceite *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.

Para visualizar mejor los resultados en la figura N° 2 se expresa la capacidad de aprendizaje en porcentajes inversamente proporcionales a sus puntajes, considerando el puntaje del grupo DMSO como ciento por ciento, por ser el grupo blanco.

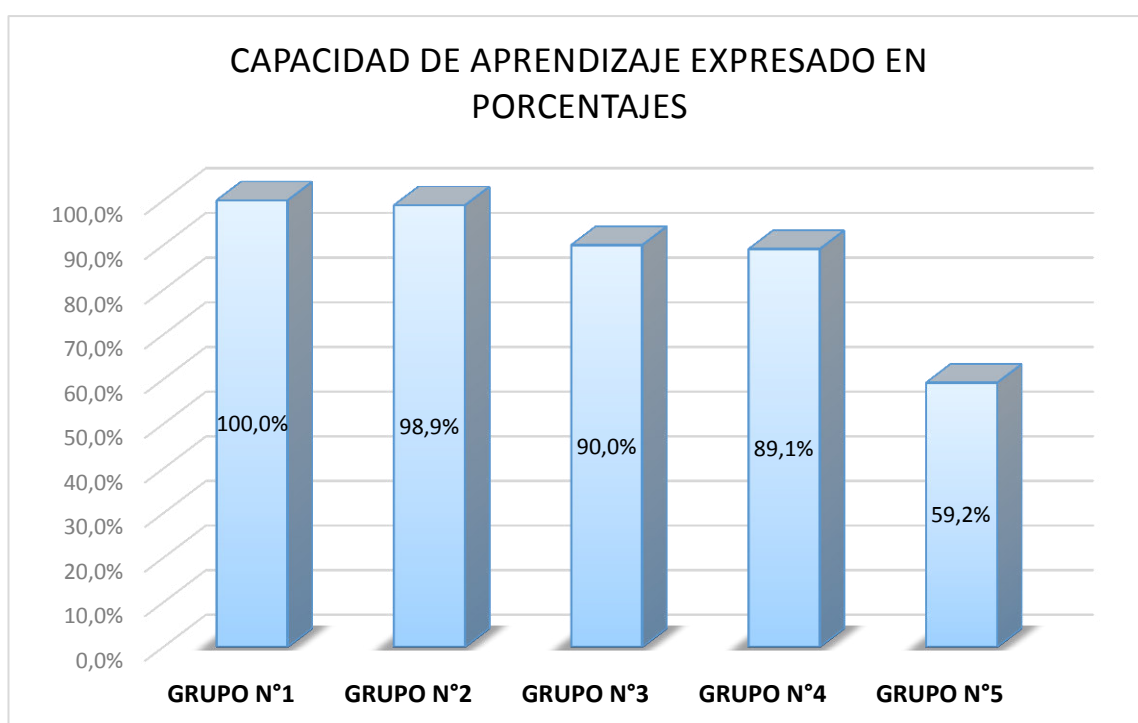


FIGURA N° 2: Resultados del test de Laberinto en Y, expresados en porcentajes.

4.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

El análisis histológico se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.4 y los resultados se muestran en la tabla N° 2 y la figura N° 3.

TABLA N° 2

Efecto de la dieta del aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” sobre daño del tejido cerebelosa en ratas crías expuestas al metilmercurio en periodo de gestación y lactancia por medio del análisis histológico

TEJIDOS	GRUPOS										TOTAL	
	Grupo N°1		Grupo N°2		Grupo N°3		Grupo N°4		Grupo N°5			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Caracteres Normales	12	100	12	0	0	0	0	0	0	0	24	36.7
Granulosa Adelgazada	0	0	1	0	1	8.3	1	8.3	3	25	2	5
Células de Purkinje adelgazada	0	0	0	0	8	66.7	6	50	1	8.3	16	26.7
Disminución de granulosa y Purkinje	0	0	0	0	3	25	5	41.7	8	66.7	18	31.6
Total	12	100	12	100	12	100	12	100	12	100	60	100

Chi cuadrado:68.48 $P < 0.05$, se encontró relación estadística.

En la tabla N° 2 se aprecia que en el total de crías de ratas que corresponden al grupo N°1 el 100% presentan tejidos normales ; del total de crías que corresponden al grupo N°2 el 100% presentan tejidos normales ; del total de crías de ratas que corresponden al grupo N°3 el 66.7% presentan la capa de Purkinje adelgazada; del total de crías de ratas que corresponden al grupo N° 4 el 41.7% presentan tejidos con la capa de granulosa disminuida y Purkinje, asimismo se observa que del

total de crías de ratas que corresponden al grupo N°5 el 66.7% presentan tejidos con capa granulosa y Purkinje disminuida, el 25 % capa granulosa adelgazadas y se encontró relación estadística $p < 0.05$.

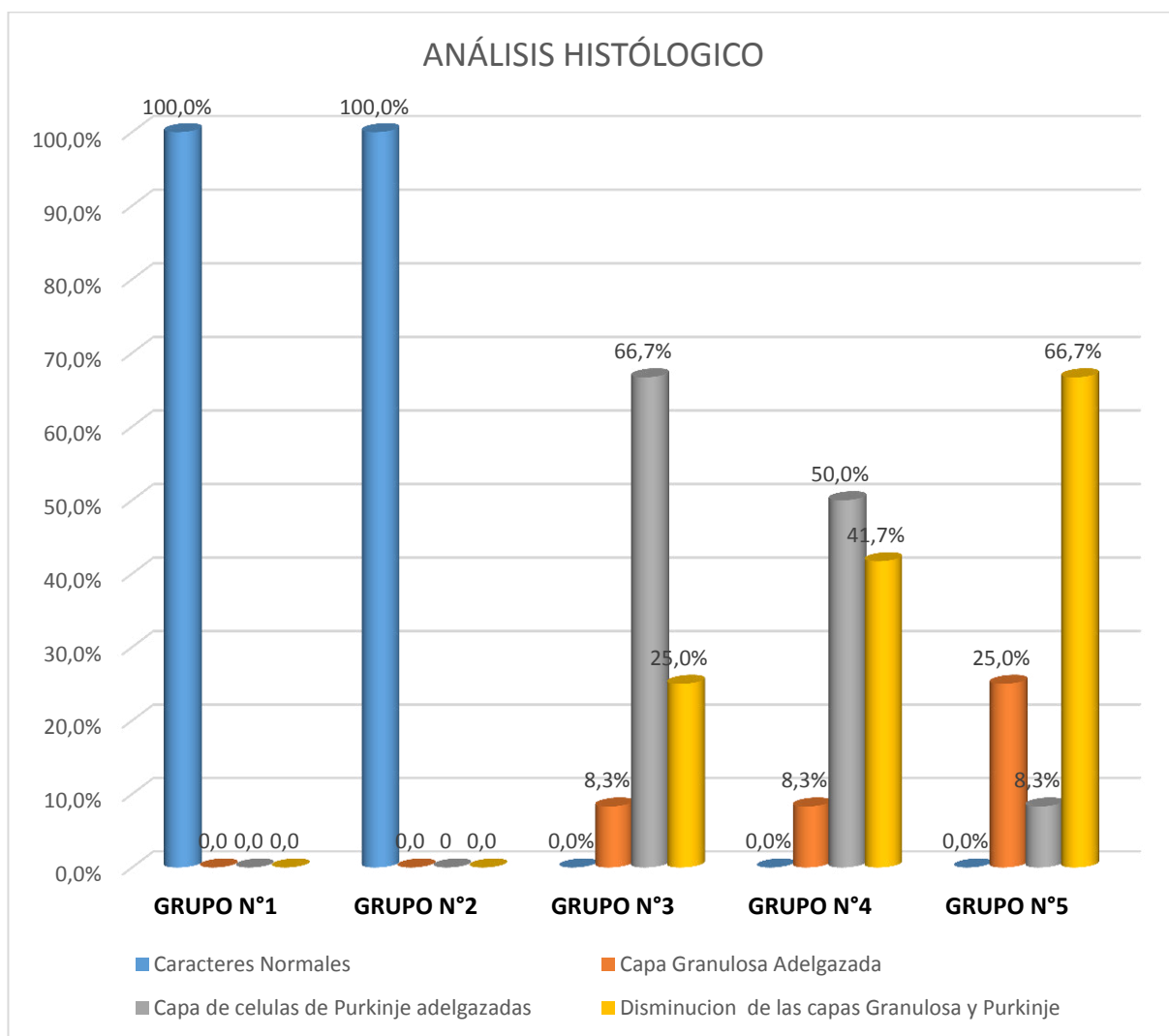


FIGURA N° 3: Resultados del análisis histológico.

4.3. ANÁLISIS BIOQUÍMICO.

El análisis bioquímico se realizó de acuerdo con el aparatado 3.5 y los resultados se muestran en la tabla N° 3 y la figura N° 4

TABLA N° 3

Efecto de la dieta suplementada con aceite de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi) sobre el estrés oxidativo en ratas crías expuestas al metilmercurio en periodo de gestación y lactancia a través de la prueba de MDA - TBARs (sustancias reactivas al tiobarbitúrico)

	N	MEDIA	DS	ANOVA	PRUEBA DE TUKEY				
					Grupo N°1	Grupo N°2	Grupo N°3	Grupo N°4	Grupo N°5
Grupo N°1	12	5.5	0.3	p=0.0000**	-	p=0.0000*	-	-	p=0.0000*
Grupo N°2	12	4.3	0.2		p=0.0000*		p=0.0000*	p=0.0000*	p=0.0000*
Grupo N°3	12	5.5	0.2		-	p=0.0000*	-	-	p=0.0000*
Grupo N°4	12	5.4	0.2		-	p=0.0000*	-	-	p=0.0000*
Grupo N°5	12	6	0.3		-	-	-	-	-

Media de los niveles de TBARs expresados en nmoles/gr de proteína

**P<0.05 existe diferencias significativas; se aplicó la prueba ANOVA

* P<0.05 existe diferencias significativas; se aplicó Prueba de Tukey.

En la tabla N°3 se aprecia que la media del estrés oxidativo en el grupo N°1 es 5.5 ± 0.3 , en el grupo N°2 es 4.3 ± 0.2 , en el grupo N°3 es 5.5 ± 0.2 , en el grupo N°4 es 5.4 ± 0.2 y en el grupo N° 5 es 6.0 ± 0.3 .

Asimismo se observa que el grupo N° 5 presentan mayor estrés oxidativo en relación a los grupos N°1, N°2, N°3 y N°4. También el estrés en el grupo N°2 es menor que el estrés en el grupo N°3 y el estrés en el grupo N°4.

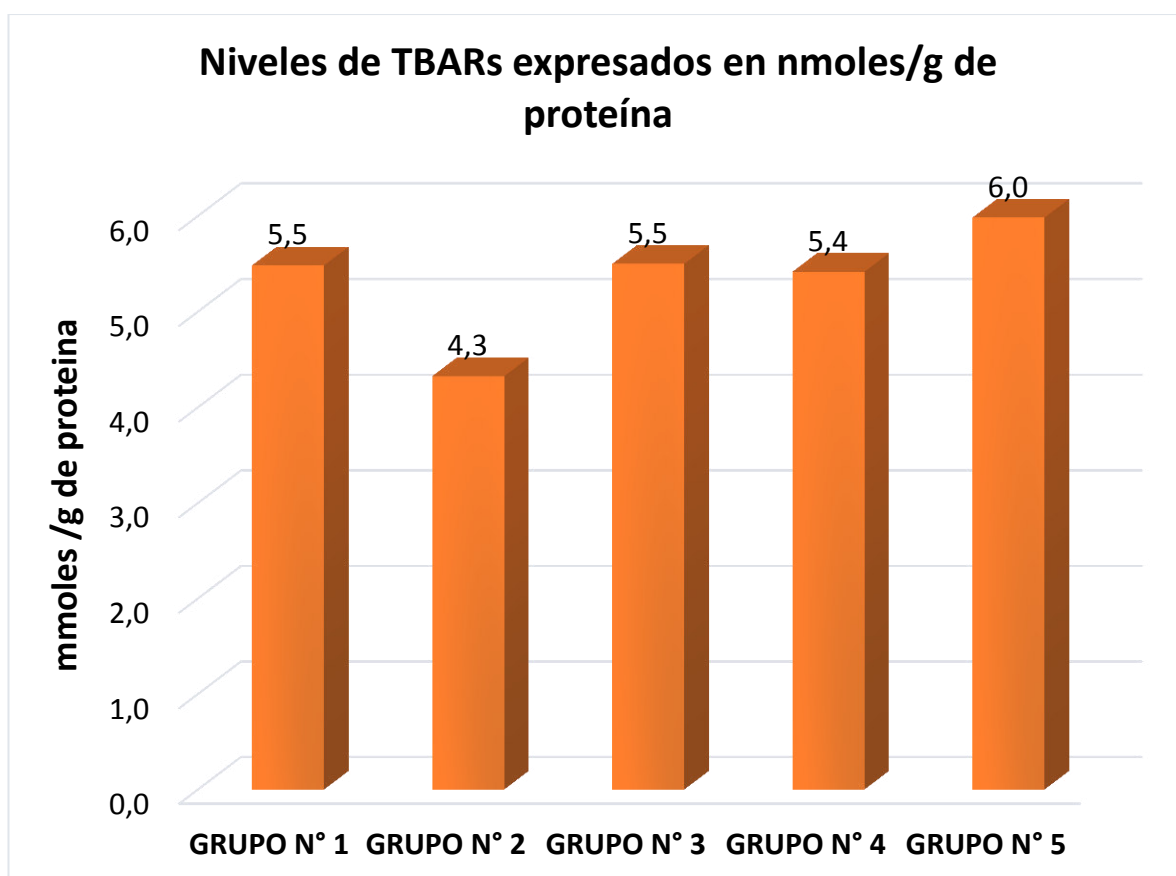


FIGURA N° 4: Resultados del análisis bioquímico.

V. DISCUSIÓN

Los resultados mostrados en la tabla N°1 indican que la exposición al metilmercurio (MeHg) durante la gestación y lactancia disminuye la capacidad de aprendizaje en el test de “Laberinto en Y”, tanto en ratas macho y hembras, debido a que numerosos estudios afirman que el metilmercurio puede atravesar fácilmente la barrera hemato-encefálica mediante mecanismos aun no muy definidos, siendo muy probable que se utilice el sistema de transporte de aminoácidos tipo – L (LAT), para el transporte de los complejos de MeHg/L-cysteine (MeHg-Cys) ^{114,115}, además el metilmercurio atraviesa la barrera placentaria alcanzando al feto ¹¹⁶, también se excreta por la leche materna, por lo cual la lactancia es un medio de exposición para los lactantes ^{117,118}.

Numerosos autores también afirman que el metilmercurio intoxicación durante la gestación y lactancia causa retraso en el desarrollo neuronal y disminución de la capacidad de aprendizaje en niños y adultos con diversos trastornos neuronales ⁴¹⁻⁴³, estos hallazgos se reafirman con estos resultados de esta tesis.

Algunos estudios afirman que la dieta suplementada con PUFAs, especialmente el omega 3, puede revertir la neurotoxicidad del metilmercurio ya que estos ácidos grasos constituyen una gran porcentaje del SNC y son esenciales en el desarrollo del SNC durante la gestación ¹¹⁹ en relación a estas afirmaciones los resultados de esta tesis

demuestran que los grupos expuestos al metilmercurio (MeHg) y con dieta suplementada con aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” , Grupo N°3 y N°4, no tienen diferencia estadísticamente significativa con el grupo N°1, pero si con el grupo expuesto al metilmercurio, grupo N°5, afirmándose que la capacidad de aprendizaje no disminuye cuando la dieta es suplementada con aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” , en ratas expuestas al metilmercurio así mismo al no encontrarse diferencias significativas entre la capacidad de aprendizaje en el test de laberinto en Y , entre los grupos N°3 y N°4, indica que la acción neuroprotectora del aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” no es dosis dependiente.

Algunos autores indican que la principal diana del metilmercurio (MeHg) es el cerebelo ¹²⁰ e induce diferentes patrones de cambios en el sistema nervioso central. Por ejemplo, el envenenamiento por mercurio en el adulto, se caracteriza por el daño de las zonas anatómicas muy localizadas de la corteza visual y disminución de la capa granular del cerebelo, también se observa en la exposición durante la lactancia ¹²¹. En el desarrollo del SNC, se observa una difusa y generalizada desorganización de la citoarquitectura de la corteza cerebral con disminución drástica de las células granulares ^{41-43,122}, además se observa incremento de la lipoperoxidación lipídica. Estas alteraciones podrían asociarse con fallas en el patrón normal de división celular inducida por la exposición a metilmercurio durante el desarrollo del SNC ¹²². De acuerdo con estos antecedentes la presente tesis enfocó el análisis histológico en

el cerebelo, los resultados muestran además de la disminución de la capa granulosa en todos los grupos expuestos al metilmercurio (MeHg), se observa además disminución de las células de Purkinje. En el grupo N°5, se observa disminución de la capa granular (25%) es superior que en los grupos N°3 y N°4 (8.3%), se puede deducir que la dieta suplementada con aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” disminuyó el daño selectivo en la capa granular del cerebelo.

Los resultados también indican que en el grupo N°5 el daño en la Capa granular y Células de Purkinje es por igual (66.7 %) y es mayor que en el grupo N° 3 y N°4, con lo que se puede inferir que la dieta suplementada con aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” disminuye la neurotoxicidad del metilmercurio.

Numerosos estudios indican que uno de los mecanismos de la neurotoxicidad del metilmercurio es generación de radicales libres y que estos efectos pueden disminuirse por la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), especialmente omega 3 (n-3) ¹¹⁹, por lo tanto en nuestro trabajo realizamos la medición de los niveles de malondialdehído de forma indirecta mediante el TBARs (sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico), los resultados de la presente tesis muestran que el grupo N°2 posee menor estrés oxidativo (4.3 nmoles/g proteínas) que el grupo N°1 (5.5 nmoles/g proteínas) y esta diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.0000^*$) por lo tanto se puede deducir que la dieta suplementada con aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” disminuye los niveles de estrés oxidativo por debajo del normal.

Los resultados de esta tesis en la tabla N° 3, indican que el grupo N°5 (6.0 nmoles/g proteínas) tiene diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0000^*$) con los demás grupos, pudiéndose afirmar que la exposición al metilmercurio incrementa los niveles de estrés oxidativo (peroxidación lipídica) en el cerebro.

Los grupos N°3 (5.5 nmoles/g proteínas) y N°4 (5.4 nmoles/g proteínas), poseen diferencia estadísticamente significativa con el grupo N°5 (6.0 nmoles/g proteínas) y en comparación con el grupo N°1 (5.5 nmoles/g proteínas) no tiene diferencia significativa, se puede afirmar que la dieta suplementada con aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” disminuye el estrés oxidativo (peroxidación lipídica) generada por la exposición al metilmercurio (MeHg) hasta niveles normales y que la disminución del estrés oxidativo no es dosis dependiente, pues los resultados del grupo N°3 y N°4 no son estadísticamente significativos.

VI. CONCLUSIONES

1. La dieta suplementada con aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” en las concentraciones de 2 y 4 mL/Kg/Día evitó el deterioro de la capacidad de aprendizaje, en las ratas crías expuestas al metilmercurio durante la gestación y lactancia.

2. La dieta suplementada con aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” en las concentraciones de 2 y 4 mL/Kg/Día evitó el incremento del estrés oxidativo, en las ratas crías expuestas al metilmercurio durante la gestación y lactancia.

3. La dieta suplementada con aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” en las concentraciones de 2 y 4 mL/Kg/Día evitó el deterioro tisular del cerebelo, en las ratas crías expuestas al metilmercurio durante la gestación y lactancia.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar mayores estudios para determinar la dosis adecuada del aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” para niños y adultos expuestos al metilmercurio.
2. Profundizar el estudio sobre el efecto neuroprotector del aceite *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” frente a otros neurotóxicos.
3. Evaluar si existe relación entre concentración de mercurio en el SNC de ratas expuestas al metilmercurio (MeHg) y la dieta suplementada con aceite *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gillette Guyonnet S, Abellan Van Kan G, Andrieu S, et al. IANA task force on nutrition and cognitive decline with aging. *J Nutr Health Aging*. 2007; 11:132–152.
2. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci*. 2000; 18: 383–399.
3. Kou W, Luchtman D, Song C. Eicosapentaenoic acid (EPA) increases cell viability and expression of neurotrophin receptors in retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cells. *European Journal of Nutr*. 2008; 47:104–113.
4. Freemantle E, Vandal M, Tremblay-Mercier J, et al. Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during aging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006; 75: 213–220.
5. Calon F, Cole G. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007; 77:287–293.
6. Freund-Levi Y, Eriksdotter-Jonhagen M, Cederholm T, et al. Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: Omeg AD study: a randomized double-blind trial. *Arch Neurol* 2006; 63:1402 – 1408.

7. Boston PF, Bennett A, Horrobin DF, Bennett CN. Ethyl-EPA in Alzheimer's disease—a pilot study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 71:341–346.
8. Kotani S, Sakaguchi E, Warashina S, et al. Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neurosci Res* 2006; 56:159–64.
9. Van de Rest O, Geleijnse JM, Kok FJ, et al. Effect of fish oil on cognitive performance in older subjects: a randomized, controlled trial. *Neurology* 2008; 71:430–8.
10. Rogers PJ, Appleton KM, Kessler D, et al. No effect of n23 long-chain polyunsaturated fatty acid (EPA and DHA) supplementation on depressed mood and cognitive function: a randomised controlled trial. *Br J Nutr* 2008; 99: 421–31.
11. El-Rahim AH, Hafiz NA. Investigation on the protective effect of Grape seed and Linseed oils against ciclophosphamide induced genotoxicity in mice. *Global Veterinaria*. 2009; 3(5):377-82.
12. Barceló-Coblijn G, Murphy EJ. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res*. 2009; 48(6):355-74.
13. Cuppett S. Oil quality indices. In: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, et al. (eds). *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2001. p. D1.4.1- D1.4.3.

14. Mottet NK, Vahter ME, Charleston JS, Friberg LT. Metabolism of methylmercury in the brain and its toxicological significance. *Metals Biol Syst* 1984; 34: 371–401.
15. Erie JC, Butz JA, Good JA, Erie EA, Burritt MF, Cameron JD. Heavy metal concentrations in human eyes. *Am J Ophthalmol*. 2005; 139: 88–93.
16. Cohen JT, Bellinger DC, Connor WE, Kris-Etherton PM, Lawrence RS, Savitz DA, et al. A quantitative risk-benefit analysis of changes in population fish consumption. *Am J Prev Med* 2005a; 29: 32–34.
17. IOM (Institute of Medicine). *Seafood choices: balancing benefits and risks*. Washington, DC: National Academies Press. 2006.
18. Schmidt CW. Environmental connections: a deeper look into mental illness. *Environn. Health Perspect*. 2007; 115(8):A6–A10. A404.
19. Landrigan PJ. What causes autism? Exploring the environmental contribution. 2010; 22(2): 219–25.
20. Barlow BK, Cory-Slechta DA, Richfield EK, Thiruchelvam M. The gestational environment and Parkinson's disease: evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder. *ReprodToxicol* 2007; 23(3): 457–70.
21. Coppede F, Migliore L. Evidence linking genetics, environment, and epigenetics to impaired DNA repair in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010; 20(4): 953–66.

22. Johnson FO, Atchison WD. The role of environmental mercury, lead and pesticide exposure in development of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology*. 2009; 30(5): 761–5.
23. Schantz SL, Widholm JJ, Rice DC. Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environ. Health Perspect.* 2003; 111(3): 357–576.
24. Schantz SL, Widholm JJ, Rice DC. Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environ Health Perspect.* 2003; 111(3): 357–576.
25. Lanphear BP, Hornung R, Khoury J, Yolton K, Baghurst P, Bellinger DC, et al. Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: an international pooled analysis. *Environ Health Perspect* 2005; 113(7):894–9.
26. Takser L, Mergler D, Hellier G, Sahuquillo J, Huel G. Manganese, monoamine metabolite levels at birth, and child psychomotor development. *Neurotoxicology* 2003; 24(4–5): 667–74.
27. Rauh VA, Garfinkel R, Perera FP, Andrews HF, Hoepner L, Barr DB, et al. Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics* 2006; 118(6): 1845–1859.
28. Perera FP, Rauh V, Whyatt RM, Tsai WY, Tang D, Diaz D, et al. Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life

- among inner-city children. *Environ Health Perspect.* 2006; 114(8): 1287–92.
29. Debes F, Budtz-Jorgensen E, Weihe P, White RF, Grandjean P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. *Neurotoxicology Teratology.* 2006; 28 (5):536–47.
 30. F.M.M. Morel, A.M.L. Kraepiel, M. Amyot, The chemical cycle and bioaccumulation of mercury, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1998; 29: 543–566. -
 31. Clarkson TW. The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect.* 2002; 110(Suppl. 1):11–23.
 32. A. Swensson, U. Ulfvarson, Distribution and excretion of various mercury compounds after single injections in poultry, *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* 1968; 26 : 259–272.
 33. Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. The toxicology of mercury—current exposures and clinical manifestations. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349 (18):1731–7.
 34. N.K. Mottet, M.E. Vahter, J.S. Charleston, L.T. Friberg, Metabolism of methylmercury in the brain and its toxicological significance, *Metal Ions Biol. Syst.* 1997; 34: 371–403.
 35. Farina M, Rocha JBT, Aschner M. Oxidative stress and methylmercury-induced neurotoxicity. Indianapolis: John Wiley & Sons; 2010; 357–85.

36. T.W. Clarkson, The pharmacology of mercury compounds, *Annu. Rev. Pharmacol.* 1972; 12: 375–406.
37. T.W. Clarkson, Human toxicology of mercury, *J. Trace Elements Exp. Med.* 1998; 11: 303–317.
38. D. Hunter, R.R. Bomford, D.S. Russell, Poisoning by methylmercury compounds, *Quart. J. Med.* 1940; 9: 193-213
39. D. Hunter, D.S. Russell, Focal cerebral and cerebellar atrophy in a human subject due to organic mercury compounds, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1954; 17: 235-241
40. T. Takeuchi, Pathology of Minamata disease, in: *Minamata Disease*, Study group of Minamata Disease, Kumamoto University, Japan. 1968: 141–228.
41. H. Matsumoto, G. Koya, T. Takeuchi, Fetal Minamata disease. A neuropathological study of two cases of intrauterine intoxication by a methyl mercury compound, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1965; 24: 563–574.
42. T. Takeuchi, H. Matsumoto, G.A. Koya, A pathological study on the fetal Minamata disease diagnosed clinically so-called infantile cerebral palsy (in Japanese), *Adv. Neurol. Sci.* 1964 ;8:145–161.
43. B.H. Choi, L.W. Lapham, L. Amin-Zaki, T. Saleem, Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect

- of methylmercury poisoning in utero, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1978; 37: 719–733.
44. F. Bakir, S.F. Damluji, L. Amin-Zaki, M. Murtadha, A. Khalidi, N.Y. al-Rawi, S. Tikriti, H.I. Dahahir, T.W. Clarkson, J.C. Smith, R.A. Doherty, Methylmercury poisoning in Iraq, *Science*. 1973; 181: 230–241.
45. M. Harada, J. Nakanishi, E. Yasoda, M.C. Pinheiro, T. Oikawa, G. de AssisGuimaraes, B. da Silva Cardoso, T. Kizaki, H. Ohno, Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon: mercury level of head hair and health effects, *Environ. Int.* 2001; 27: 285–290.
46. Fraser B. Peruvian gold rush threatens health and the environment. *Environ Sci. Technol.* 2009; 43(19):7162–7164.
47. BBC News, (2009) Peru's gold rush sparks fears of ecological disaster. BBC News) (Swenson JJ, et al. Gold mining in the Peruvian Amazon: global prices, deforestation, and mercury imports. 2011; 6(4):e18875.
48. [Ellen E. Yard](#), [Jane Horton](#), [Joshua G. Schier](#). Mercury Exposure Among Artisanal Gold Miners in Madre de Dios, Peru: A Cross-sectional Study. *J Med Toxicol.* Dec 2012; 8(4): 441–448.
49. A. Renzoni, F. Zino, E. Franchi, Mercury levels along the food chain and risk for exposed populations, *Environ. Res.* 1998; 77: 68–72.

50. M. Horvat, S. Covelli, J. Faganeli, M. Logar, V. Mandic, R. Rajar, A. Sirca, D. Zagar, Mercury in contaminated coastal environments; a case study: the Gulf of Trieste, *Sci. Total Environ.* 1999: 43–56.
51. S. Skerfving, V. Bencko, M. Vahter, A. Schutz, L. Gerhardsson, Environmental health in the Baltic region—toxic metals, *Scand. J. Work Environ. Health.* 1999;25: 40–64.
52. U.S. Food and Drug Administration and U.S. Environmental Protection Agency, What You Need to Know About Mercury in Fish and Shellfish, 2004.
53. G.E. McKeown-Eyssen, J. Ruedy, A. Neims, Methylmercury exposure in northern Quebec. II. Neurologic findings in children, *Am. J. Epidemiol.* 1983; 118: 470–479.
54. T. Kjellström, P. Kennedy, S. Wallis, A. Stewart, L. Friberg, B. Lind, P. Wutherspoon, C. Mantell, Physical and Mental Development of Children with Prenatal Exposure to Methylmercury in Fish. Stage 2, Interviews and Psychological Test at Age 6, Solna, National Swedish Environmental Protection Board Report. 1989: 3642
55. C. Freire, R. Ramos, M.J. Lopez-Espinosa, S. Diez, J. Vioque, F. Ballester, M.F. Fernandez, Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain, *Environ. Res.* 2010; 110: 96–104.

56. Kandel, E. R. Principles of Neural Science. New York: McGraw Hill. 2000
57. Schmahmann, J. D. An emerging concept. The cerebellar contribution to higher function. Arch. Neurol. 1999; 48: 1178-1187
58. Kim, S.G. Activation of a cerebellar output nucleus during cognitive processing. Science. 1999; 265:949-951.
59. Wiggs, C.L. Neural Correlates of semantic and episodic memory retrieval. Neuropsychologia. 1999; 37: 103 -118.
60. Arriada – Menticora. Current concepts regarding the Cerebellum and cognition. Rev. Neurol. 1999; 29:1075 – 1082.
61. Patel, n. Phenserine, a novel acetylcholinesterase inhibitor, attenuates impaired learning of rats in a 14 unit T- Maze induced by blockade of the N-methyl-d-aspartate receptor. Neuroreport. 1998; 9:171-176.
62. Magni, S. Radial maze type as a determinant of choice behavior of rats. J Neurosci. Methods. 1979; 1: 343-352.
63. Morris, R.G. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. Nature. 1983; 319: 774-776.

64. Aguilar, M.A. Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Exp. Neurol.* 1988;161: 704-713.
65. Hernandez-Viadel, M. Chronic exposure to 2,5-hexanedione impairs the glutamate – nitric oxide- cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and rat brain *in vivo*. *Neurochem. Int.* 2003; 42: 525-533.
66. Lehninger A. Lípidos, lipoproteínas y membranas. En: *Bioquímica*. EEUU: Worth Publishers. 1985; 285-312.
67. Mayes P. Metabolismo de los ácidos grasos insaturados y de eicosanoides. En: Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell v, eds. *Bioquímica de Harper*. México: Manual Moderno. 2001; 289-298.
68. Deckelbaum RJ, Worgall TS, Seo T. N-3 fatty acids and gene expression. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 83: 1520S-1525.
69. Van Elswyk, M. Nutricional and physiological effects of flax seed in diets for laying fowl. *Poultry science* 1997; 53: 253-264.
70. Cherian G, Sim JS. Maternal dietary α -linolenic acid (18:3 n-3) alters n-3 polyunsaturated fatty acid metabolism and liver enzyme activity in hatched chicks. *Poultry science* 2001; 80:901-905.
71. Leaf A, Kang JX, Xiao YF, Billman GE. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation*. 2003; 107:2646–2652.

72. Carrero JJ, Martín-Bautista E, Baró L, Fonollá J, Jimenez J, Boza JJ, Lopez-Huertas E. Efectos cardiovasculares de los ácidos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutr. Hosp.* 2005; 1: 63-69.
73. Knoch B, Barnett MPG, Roy NC y McNabb WC. Study of the effects of dietary polyunsaturated fatty acids: Molecular mechanisms involved in intestinal inflammation. 2009; 60 (1): 8-21.
74. Cherian G. Egg quality and yolk polyunsaturated fatty acid status in relation to broiler breeder hen age and dietary n-3 oils. *Poultry science* 2008; 87:1131-1137.
75. Yehuda S, Rabinovitz S, Mostofsky DI. Essential fatty acids are mediators of brain biochemistry and cognitive functions. *J Neurosci. Res.* 1999; 56: 565.
76. Bourre JM, Dumont O, Piciotti M, et al. Essentiality of omega 3 fatty acids for brain structure and function. *World Rev. Nutr. Diet.* 1991; 66: 103.
77. Valentine RC, Valentine DL. Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept. *Prog. Lipid. Res.* 2004; 43 (5):383-402.
78. Hering H, Lin CC, Sheng M. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci.* 2003; 23 (8):62-71.
79. Lengqvist J, Mata De Urquiza A, Bergman AC, Willson TM, Sjoval J, Perlmann T, et al. Polyunsaturated fatty acids including

- docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol. Cell. Proteomics*.2004;3 (7):692-703.
80. Rioux L, Arnold SE. The expression of retinoic acid receptor alpha is increased in the granule cells of the dentate gyrus in schizophrenia. *Psychiatry. Res.* 2005; 133(1):13-21.
81. Uauy R, Hoffman DR, Peirano P, et al. Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids.* 2001; 36:885-895.
82. Alexandra J. Richardson. The importance of omega-3 fatty acids for behaviour, cognition and mood University Laboratory of Physiology, Oxford, UK. *Scandinavian Journal of Nutrition.* 2003; 47 (2): 92-98.
83. Singh M. Essential fatty acids, DHA and human brain. *Indian J. Pediatr.* 2005; 72(3):239-242.
84. Stillwell W, Wassall SR. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem. Phys. Lipids.* 2003; 126(1):1-27.
85. Armstrong VT, Brzustowicz MR, Wassall SR, Jenski LJ, Stillwell W. Rapid flip-flop in polyunsaturated (docosahexaenoate) phospholipid membranes. *Arch Biochem. Biophys.* 2003; 414(1):74-82.
86. Chapkin RS, Wang N, Fan YY, Lupton JR, Prior IA. Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains. *Biochim Biophys. Acta.* 2008; 1778(2):466-471.
87. Ehringer W, Belcher D, Wassall SR, Stillwell W. A comparison of the effects of linolenic (18:3 omega 3) and docosahexaenoic (22:6

- omega 3) acids on phospholipid bilayers. *Chem Phys Lipids* 1990; 54(2):79-80.
88. Huster D, Arnold K, Gawrisch K. Influence of docosahexaenoic acid and cholesterol on lateral lipid organization in phospholipid mixtures. *Biochemistry*. 1998; 37(49):17299-308.
89. Kafrawy O, Zerouga M, Stillwell W, Jenski LJ. Docosahexaenoic acid in phosphatidylcholine mediates cytotoxicity more effectively than other omega-3 and omega-6 fatty acids. *Cancer Letters*. 1998; 132(1-2):23-29.
90. Wassall SR, Stillwell W. Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain. *Chem Phys Lipids*. 2008; 153(1):57-63.
91. Stillwell W, Shaikh SR, Zerouga M, Siddiqui R, Wassall SR. Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reproductive Nutr. Dev*. 2005; 5(5):559-579.
92. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacotherapy*. 2002; 56: 365-379.
93. Marianne Haag, MSc, DSc1. Essential Fatty Acids and the Brain. *Can J Psychiatry*. 2003; 48:195-203.
94. Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging*. 2002; 23: 795–807.

95. Rodriguez J, Menendez J, Trujillo Y. Radicales Libres en la Biomedicina y Estrés Oxidativo. Revista cubana Médica Militar. 2001; 30 (1):15-20.
96. Elejalde J. Estrés oxidativo, Enfermedades y tratamientos antioxidantes. Ann. Med. Intern. 2001; 18:326-335.
97. Giménez A. Púrpura de Schölein-Henoch y estrés oxidativo. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona.
98. Powers S, Jackson M. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. Physiological Reviews. 2008; 88:1243-1276.
99. García P. Oxidantes y Antioxidantes. El rincón del entrenador.. Gatorade Sports Science Institute. Caracas. 2002;31.
100. Ríos de Molina M. El estrés oxidativo y el destino celular. Revista Química Viva. 2003;2 (1).
101. Martínez M. Toxicidad de Xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. Ars. Pharmaceutical. 1998; 39 (1): 5 – 18.
102. Cabrera C., Robles E. Evaluación del efecto antioxidante del ejercicio moderado y continuo en individuos con entrenamiento físico regular. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Farmacia Y Bioquímica. 2010.
103. Kim J, Diamond D. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. Nat. Rev. Neurosci. 2002; 3(6):453-462.

104. Guillén MD, Ruiz A, Cabo N, Chirinos R, Pascual G. Characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil by FTIR spectroscopy and ¹H NMR. Comparison with Linseed oil. JAOCS, Vol. 2003; 80(8):755–762.
105. Krivankova B, Polesny Z, Lojka B, Lojkova J, Banout J, Preininger D. Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*, *Euphorbiaceae*): a promising oilseed crop from Peruvian Amazon. 2007.
106. Conference on International Agricultural Research and Development,. Universidad de Kassel, Witzenhausen y Universidad de Gotinga, Alemania. 2007.
107. Gillespie LJ. A synopsis of neotropical *Plukenetia* (*Euphorbiaceae*) including two new species. Systematic Botany. 1993; 18 (4): 575 – 592.
108. Pascual G, Mejía M. Extracción y caracterización del aceite de sachá inchi (*Plukenetia vulubilis*). Anales científicos UNALM. La molina, Lima-Perú. 2000; 42 :144-158.
109. Hamaker, E.; et al. “Aminoacid and Fatty Acid Profil of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L)”. American association of cereal chemist. 1992; 69: 461- 465.
110. Maestro RF, McDonald W. Oxidative Enzymes in Tissue Homogenates. CRC. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research 1990; 2: 291-296.
111. Arias Rodríguez, Rody, Toma Zárate, Jimmy Pascual, Aguilar Felices, Enrique Javier. Neuroprotección del extracto

- hidroalcohólico de las hojas de *Satureja brevicalyx* 'wayra muña' en un modelo animal de hiperoxia e hipoxia-isquemia. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2012; 73(3): 215-219.
112. Buege, J.A., Aust, S.D., Microsomal lipid, Peroxidation. In: Flesicher, S., Packer, L. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New-York, 1978; 52: 302–310.
 113. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-75.
 114. M. Aschner, J.L. Aschner, Mercury neurotoxicity: mechanisms of blood–brain barrier transport, *Neurosci. Biobehav*. 1990; 14: 169–176.
 115. N.K. Mottet, M.E. Vahter, J.S. Charleston, L.T. Friberg, Metabolism of methylmercury in the brain and its toxicological significance, *Metal Ions Biol. Syst*. 1997; 34: 371–403.
 116. M. Vahter, A. Akesson, B. Lind, U. Bjors, A. Schutz, M. Berglund, Longitudinal study of methylmercury and inorganic mercury in blood and urine of pregnant and lactating women, as well as in umbilical cord blood, *Environ*. 2000; 84: 186–194.
 117. P. Grandjean, P.J. Jorgensen, P. Weihe, Human milk as a source of methylmercury exposure in infants, *Environ. Health Perspect*. 1994; 102: 74–77.
 118. A. Oskarsson, A. Schultz, S. Skerfving, I.P. Hallen, B. Ohlin, B.J. Lagerkvist, Total inorganic mercury in breast milk in relation to

- fish consumption and amalgam in lactating women, *Arch. Environ. Health*. 1996; 51: 234–241.
119. National Research Council. Toxicological Effects of Methylmercury. The National Academies Press. Washington, DC. 2000: 74-80.
120. Sanfeliu, C., Sebastia, J., Cristofol, R., Rodriguez-Farre, E., Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox. Res*. 2003; 5: 283–305.
121. Franco, J.L., Teixeira, A., Meotti, F.C., et al. Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environ. Res*. 2006; 102: 22–28.
122. Vettori MV, Alinovi R, Belletti S, Goldoni M, Franchini I, Mutti A. In vitro models for the evaluation of the neurotoxicity of methylmercury. Current state of knowledge. *Med. Lav*. 2003; 94(2):183–91.

IX. ANEXOS

9.1. Laberinto en Y negro



9.2. Laberinto en Y blanco



9.3. Resultado negativo en el test de aprendizaje.



9.4 Resultado positivo en el test de aprendizaje.

